

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Química

Filipe Soares da Cruz

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS
UTILIZANDO ELETRODOS IMPRESSOS DE GRAFITE MODIFICADOS
COM POLI(ÁCIDO 4-AMINOBENZÓICO) APLICADOS AO DIAGNÓSTICO
DE ZIKA VÍRUS**

Diamantina-MG

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Química

Filipe Soares da Cruz

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS UTILIZANDO
ELETRODOS IMPRESSOS DE GRAFITE MODIFICADOS COM POLI(ÁCIDO 4-
AMINOBENZÓICO) APLICADOS AO DIAGNÓSTICO DE ZIKA VÍRUS**

Diamantina-MG

2018

Filipe Soares da Cruz

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS UTILIZANDO
ELETRODOS IMPRESSOS DE GRAFITE MODIFICADOS COM POLI(ÁCIDO 4-
AMINOBENZÓICO) APLICADOS AO DIAGNÓSTICO DE ZIKA VÍRUS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira
Coorientador: Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira

Diamantina-MG

2018

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Nadia Santos Barbosa Costa CRB6 - 2972

C957d Cruz, Filipe Soares da Cruz.
2017 Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos utilizando eletrodos impressos de grafite modificados com poli(ácido 4-aminobenzóico) aplicados ao diagnóstico de Zika vírus/ Filipe Soares da Cruz, 2019.
85 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Biossensor. 2. Zika Vírus. 3. Diagnóstico. 4. RNA. 5. Eletropolimerização. I. Ferreira, Lucas Franco. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

CDD 547

Filipe Soares da Cruz

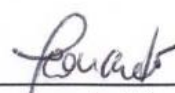
**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS UTILIZANDO
ELETRODOS IMPRESSOS DE GRAFITE MODIFICADOS COM POLI(ÁCIDO 4-
AMINOBENZÓICO) APLICADOS AO DIAGNÓSTICO DE ZIKA VÍRUS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.


Orientador: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira
Coorientador: Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira



Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira – Orientador
Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT/UFVJM



Prof. Dr. Leonardo Moraes da Silva – Membro
Faculdade de Ciências Exatas – FACET/UFVJM



Prof. Dr. Diego Leoni Franco – Membro Externo
Instituto de Química – IQ/UFU

Diamantina-MG

2018



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
DIAMANTINA – MINAS GERAIS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



ATESTADO DE DEFESA POR VIDEOCONFERÊNCIA

Atesto para os devidos fins que no dia 13 de dezembro de 2018, às 09h, nas dependências da UFVJM em Diamantina-MG, foi realizada a defesa de dissertação do discente FILIPE SOARES DA CRUZ com o trabalho intitulado *“Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos utilizando eletrodos impressos de grafite modificados com poli(ácido 4-aminobenzóico) aplicados ao diagnóstico de Zika vírus”* sob minha orientação no Programa de Pós-graduação em Química – PPGQ.

Na qualidade de presidente da banca, atesto que o Prof. Dr. DIEGO LEONI FRANCO, docente da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, *Campus* Patos de Minas, participou através de videoconferência.

Em virtude da participação remota do membro da banca acima indicado, eu, LUCAS FRANCO FERREIRA, enquanto servidor público, no gozo de fé pública, assino no lugar desse na Ata de Defesa e na Folha de Aprovação da referida defesa.

Por ser verdade, dou fé e assino o presente atestado.

Diamantina-MG, 13 de dezembro de 2018.



Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira – SIAPE: 1750341
Orientador

Aos meus pais, pelo amor incondicional que só é proporcionado por eles, pela paciência e
confiança, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu refúgio nos tempos difíceis, por me proporcionar vivenciar todos os sentimentos em suas dualidades e complexidades, me fazendo humano e falho, capaz de perceber meus erros e toda minha ignorância perante o todo.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por todo o ensinamento aplicado durante minha vida, por me proporcionar a oportunidade de estudo, sempre frisando a importância do conhecimento na vida de uma pessoa.

À minha irmã Tereza Cristina, por ser uma parte de mim totalmente diferenciada, me ensinando a respeitar as diferenças e pelo apoio e não julgamento perante minhas escolhas. Por ser mais que irmã e sim amiga.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira principalmente por todo o conhecimento compartilhado desde a graduação, me fazendo apaixonar pelos métodos de análise e por me inserir dentro do fantástico mundo da química analítica. Pelas cobranças, pela orientação e disponibilidade em toda minha vida acadêmica. Pelo caráter e profissionalismo, deixando claro que nem sempre as coisas são fáceis, mas que sempre vale a pena a tentativa, enfim por sempre acreditar em mim como orientando.

Ao Prof. Dr. Danilo Bretas, pelas amostras de material biológico concedidas, pela excelente colaboração, paciência e disposição demonstradas durante a elaboração deste trabalho.

Ao Grupo de Eletroquímica e Nanotecnologia Aplicada (GENAp), em especial aos amigos Cátia Cruz e Ricardo Correa, companheiros de trabalho e que sempre estiveram comigo desde o início da minha caminhada, mostrando que nunca se desenvolve um trabalho sozinho.

Aos meus colegas do grupo GENAp, pelo companheirismo no laboratório, pelos momentos de descontração e de troca de conhecimentos.

À minha amiga Taís Reis, por sempre estar comigo independente da hora, do dia, do humor, da dificuldade, por sempre estar disposta a me ajudar, pelos conhecimentos compartilhados, pelas risadas, pelos desabafos e por se tornar tão especial.

À minha amiga Laryssa Fernanda, que entrou em minha vida para nunca mais sair, me demonstrando o quão batalhadoras as pessoas são e como a vida foi feita para ser vivida em sua plenitude.

À minhas amigas Ana Lisa Moreira e Anna Clara, por me ensinar o que é paciência e companheirismo nestes 10 anos de convivência. Pela cumplicidade, pela atenção desprendida durante toda a nossa caminhada. Por me ensinar a ver sempre o bem nas pessoas e por compartilharem suas vidas comigo.

A todos os amigos que estiveram comigo desde sempre, em especial, Raphael, Diego, Fernando, Taís e Grazielle por sempre me apoiarem nas mais difíceis escolhas.

Aos membros da banca que aceitaram participar e contribuir para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante toda a realização deste trabalho.

À UFVJM, pela oportunidade de crescimento e por me proporcionar o encontro com tantas pessoas especiais.

Muito obrigado!

“Eu consigo calcular o movimento dos corpos celestiais,
mas não a loucura das pessoas.
(Isaac Newton)”

RESUMO

Em 11 de novembro de 2015, o Ministério da Saúde do Brasil relatou uma epidemia causada pelo vírus Zika no Nordeste do país. Além disso, muitos recém-nascidos apresentaram uma redução no crânio, chamada microcefalia, levando vários pesquisadores a relacionarem os dois fatos. O vírus Zika (ZIKV) é um flavivírus transmitido por mosquitos relacionado ao vírus da febre amarela, vírus da dengue (DENV) e vírus do Nilo Ocidental (VNO). É um vírus de RNA positivo de cadeia simples, que está intimamente relacionado ao vírus Spondweni, e é transmitido por muitos *Aedes spp.* mosquitos, incluindo *Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. hensilli* e *Ae. aegypti*. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para diagnóstico do Zika vírus através de biossensor eletroquímico. Para isto, realizou-se a eletropolimerização do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA) sobre eletrodos impressos de grafite (EIG) para o desenvolvimento da plataforma eletroquímica transdutora. A eletrogeração do poli(4-ABA) foi realizada em solução de ácido perclórico utilizando-se a técnica de voltametria cíclica (VC). Nos estudos por VC, os EIG foram modificados aplicando-se 10 ciclos de potenciais consecutivos, no intervalo de -0,2 a +1,2V em velocidade de varredura de 50 mV/s. A solução do monômero foi preparada em concentração de 2,50 mM em solução de HClO₄ 0,50 M. Após eletropolimerização, os EIG modificados com poli(4-ABA), denotados como poli(4-ABA)/EIG, foram cuidadosamente lavados com água ultra pura e secos usando um fluxo de N₂(g). Tanto os EIG quanto poli(4-ABA)/EIG foram caracterizados em solução do eletrólito e também em solução do par redox ferricianeto/ferrocianeto de potássio, utilizando-se as técnicas de VC, espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Posteriormente, os poli(4-ABA)/EIG foram utilizados para imobilização de um oligonucleotídeo específico, contendo 35 pares de base capaz de reconhecer o RNA do vírus Zika. Azul de metileno foi utilizado como agente intercalador, e as técnicas de Voltametria de Pulso Diferencial (VDP) e Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram utilizadas para reconhecimento do evento de imobilização e reconhecimento do alvo específico. Observou-se que a EIE apresentou melhores resultados frente a VPD e que após ocorrer o evento de reconhecimento, a resistência a transferência de carga diminuiu cerca de 80% para as três diluições do alvo específico utilizadas, que foram: 1:10, 1:100 e 1:1000. Analisou-se também a interação com um alvo não específico (amostras de soro contaminadas com o vírus dengue) os resultados adquiridos não se assemelhavam a aqueles obtidos com o reconhecimento do alvo específico. Estudou-se também a estabilidade do sensor proposto por 78 dias e verificou-se que a resistência a transferência de carga do sensor estabilizou-se por volta de 3.000 Ω. Tais resultados indicam uma promissora aplicação da plataforma proposta no reconhecimento de alvos específicos do ZIKV, bem como o desenvolvimento de biossensores.

Palavras-chaves: biossensor, Zika vírus, diagnóstico, RNA, poli(4-ABA), eletropolimerização.

ABSTRACT

In November 11th of 2015, the Health Minister of Brazil reported an epidemic caused by a virus known as Zika Virus on the Northeast of the Country. Furthermore, many of the newborn presented a reduction of the size the skull, called microcephaly, leading the researchers to relate both facts together. Zika virus (ZIKV) is an flavivirus transmitted by mosquitoes related to the virus to the yellow fever, dengue's virus (DENV) and Nile Occidental's virus (NOV). It is RNA virus of a positive-sense single-stranded, that is closely related to a Spondweni virus, and it is transmitted by many *Aedes spp* mosquitoes including *Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. hensilli* and *Ae. aegypti*. The present study had the objective develop a methodology for a diagnosis of the Zika virus through an electrochemical biosensor. For that, an electro-polymerization of the acid 4-aminobenzoic (4-ABA) was conducted on Screen-Printed Graphite Electrodes (SPGE) to develop the electrochemical transducer platform. The electrogeneration of poly(4-ABA) was carried out in perchloric acid solution using Cyclic Voltammetry (CV). On the studies for a CV, the SPGE were modified applying 10 cycles of consecutives potentials, in a range of -0.2 to +1.2V by a scan rage of 50 mv/s. The monomer solution was prepared in a concentration of 2.50 mM in a solution of HClO₄ 0.50 M. After the electropolymerization, the modified SPGE with poly(4-ABA) detonated with poly(4-ABA)/SPGE, were carefully washed using ultrapure water e dried using a N₂(g) flow. Both SPGE and poly(4-ABA)/SPGE were characterized in electrolyte solution and in solution of ferricyanide/ potassium ferrocyanide redox couple, using CV, electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and scanning electron microscopy (SEM). Posteriorly, the poly(4-ABA)/SPGE were used for immobilization and detection of a specific oligonucleotide, containing 35 base pairs capable of recognizing the Zika virus RNA. Methylene blue was used as intercalating agent, and differential pulse voltammetry (DPV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used to recognize an immobilization event and a specific target. It was observed that, EIS presented better results than DPV, and after the recognition event, the resistance to transfer load was reduced about 80% to the three specific target dilutions used, which were 1:10, 1:100 and 1:1000. It was analysed also that, the interaction with a non-specific target (samples of serum contaminated with the dengue virus), the results acquired did not resemble the specific target recognition results. The study also was conducted on the stability of the proposed sensor for 78 days and it was verified that the sensor *R_{ct}* was stabilized around 3000 Ω . The results indicate a promising application of the proposed platform for ZIKV specific target recognition, as well as the biosensors development.

Keywords: biosensor, Zika virus, diagnosis, RNA, poly(4-ABA), electropolymerization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos componentes de um biossensor.....	30
Figura 2: Classificação dos biossensores de acordo com a transdução aplicada.	31
Figura 3: Esquema representativo das principais técnicas de imobilização de biomoléculas utilizadas na construção de biossensores.....	38
Figura 4: VC do EIG em solução $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. $v = 100$ mV/s.	50
Figura 5: Esquema ilustrativo de que demonstram reações de transferência de elétrons homogênea e heterogênea do tipo <i>inner</i> e <i>outer-sphere</i> . No exemplo, um eletrodo de ouro metálico está imerso em uma solução eletroativa. As reações demonstram uma TE heterogênea entre um íon metálico complexo (MZ^+) e o eletrodo de ouro (Au). Em a) e b) as reações ocorrem como de esfera externa no formato heterogêneo, como no exemplo citado no corpo do texto, a oxidação/redução de $[Fe(CN)_6]^{3-} + e^-(Au \text{ eletrodo}) \rightleftharpoons [Fe(CN)_6]^{4-}$. Em c) uma situação em que a TE ocorre como esfera interna (<i>inner-sphere</i>), onde um íon intermediário (Xn^-) está ligado tanto ao Au quanto ao íon metálico redox. Observe que todas as reações ocorrem na região interfacial do eletrodo, conhecida como dupla-camada elétrica (DL).	52
Figura 6: VC do EIG em solução $HClO_4$ 0,50 M, $v = 100$ mV/s.....	54
Figura 7: Primeiro ciclo de potencial registrado para o 4-ABA em concentração de 2,50 mM utilizando-se ácido perclórico 0.50 M como eletrólito suporte. $v = 50$ mV/s. Sendo: (A) EG utilizado por Ferreira e colaboradores (2015) e (B) EIG.	55
Figura 8: VCs consecutivos do EIG em solução de 2,50 mM de 4-ABA. Eletrólito suporte: $HClO_4$ 0,50 M. Número de ciclos = 10; $v = 50$ mV/s. Sendo: (---) 1º ciclo de potencial. Inserido: Estrutura química do 4-ABA.....	56

Figura 9: VCs obtidos em solução de ácido perclórico 0,50 M, na ausência do monômero, para os eletrodos: (---) EIG e (—) poli(4-ABA)/EIG. $\nu = 100$ mV/s.....	57
Figura 10: VCs do EIG e poli(4-ABA)/EIG em solução aquosa de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,0 mM contendo KCl 0,10 M. Sendo: (---) EIG e (—) poli(4-ABA)/EIG. $\nu = 100$ mV/s.....	58
Figura 11: Imagens de MEV para: (A) EIG e (B) poli(4-ABA)/EIG. Ampliações de (1) 100x, (2) 500x, (3) 1000x e (4) 5000x.....	60
Figura 12: Diagramas de Nyquist: obtidos para o (o) EIG e (□) poli(4-ABA)/EIG em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. Potencial aplicado = OCP.....	62
Figura 13: VPDs obtidos para a redução do azul de metileno sobre: (A) EIG, (B) poli(4-ABA)/EIG e (C) RNAsensor. Eletrólito: tampão fosfato 0,10 M em pH 7,0. [Sonda] = 200 μ M.	64
Figura 14: VPDs obtidos para a redução do azul de metileno sobre: (A) EIG, (B) poli(4-ABA)/EIG e (C) RNAsensor. Eletrólito: tampão fosfato 0,10 M em pH 7,0. [Sonda] = 10 μ M.	65
Figura 15: VPDs obtidos para a redução do azul de metileno sobre: (A) RNAsensor e (B) RNAsensor + alvo específico. Eletrólito: tampão fosfato 0,10 M em pH 7,0. [Sonda] = 50 μ M.	66
Figura 16: Diagramas de Nyquist para (Δ) RNAsensor e (□) poli(4-ABA)/EIG obtidos em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. $E_{ap} = OCP$	68
Figura 17: Diagramas de Nyquist obtidos para a imobilização do oligonucleotídeo sobre: (o) EIG e (Δ) poli(4-ABA)/EIG em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. $E_{ap} = OCP$	68

Figura 18: Diagramas de Nyquist obtidos para (Δ) RNAsensor e (\bullet) RNAsensor + alvo complementar (sem aquecimento alvo) obtidos em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. Eap = OCP.69

Figura 19: Diagramas de Nyquist obtidos para (Δ) RNAsensor e (\bullet) RNAsensor + alvo complementar obtidos em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. Eap = OCP. Amostras do alvo complementar diluídas em: (I) 1:10, (II) 1:100 e (III) 1:1000.....70

Figura 20: Diagramas de Nyquist obtidos para (Δ) RNAsensor e (\bullet) RNAsensor + água obtidos em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. Eap = OCP.72

Figura 21: Diagramas de Nyquist obtidos para (Δ) RNAsensor, (\blacksquare) RNAsensor + alvo inespecífico obtidos em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. Eap = OCP.....72

Figura 22: Gráfico representativo das Rtc em função do período de armazenamento do RNAsensor.74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros relativos à sequência P1 5631-5665 do genoma do ZIKV.....	48
Tabela 2: Parâmetros físico-químicos relativos à sequência P2 10519-10551 do genoma do ZIKV.....	48
Tabela 3: Resumo dos sistemas apresentados durante o trabalho e das respectivas resistências a transferência de carga obtidas através da técnica de EIE.	73
Tabela 4: Valores de R_{tc} para o RNAsensor obtidos durante 78 dias de armazenamento a 10 °C.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ	Micro
4-ABA	Ácido 4 aminobenzóico
AM	Azul de metileno
CA	Cronoamperometria
DDK	Dermadistinctina K
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	Fita dupla de DNA
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
EIG	Eletrodo impresso de grafite
HClO₄	Ácido perclórico
Hz	Hertz
IgM	Imunoglobulina M
Ipa	Corrente de pico anódica
Ipc	Corrente de pico catódica
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
k	Kilo
L	Litro
LD	Limite de detecção
M	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Min	Minutos
mL	Mililitros
mV/s	Milivolts por segundo
OCP	Potencial de circuito aberto do inglês <i>Open Circuit Potential</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
poli(4-ABA)	Filme polimérico derivado do ácido 4-aminobenzóico
POPC- 1	Palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time
s	Segundos
ssDNA	Simples fita de DNA

TE	Transferência eletrônica
Vel	Velocidade
V	Volts
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
W	Impedância de Warburg
Z'	Componente real de impedância (resistiva)
Z''	Componente imaginária de impedância (capacitiva)
ZIKV	Zika Vírus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REFERENCIAL TEÓRICO	27
2.1 – ZIKV no mundo e no Brasil	27
2.2 – Biossensores	29
2.3 – Transdutores	31
2.4 – Receptores.....	33
2.4.1 – Genossensores.....	34
2.5 – Técnicas de imobilização.....	36
2.6 – Polímeros condutores aplicados em biossensores	39
3. OBJETIVOS	41
3.1 – Objetivo geral	41
3.2 – Objetivos específicos	41
4. METODOLOGIA.....	43
4.1. Procedimento Experimental.....	43
4.1.1 – Eletropolimerização do 4-ABA	43
4.1.2 – Medidas de microscopia eletrônica de varredura	43
4.1.3 – Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE).....	44
4.1.4 – Construção, caracterização e estabilidade do RNAsensor.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 - Estudo das características do poli(4-ABA) sob EIG	49
5.1.1 - Avaliação e condicionamento dos eletrodos impressos de grafite	49
5.1.2 Eletropolimerização do 4-ABA	54
5.1.3 Comportamento eletroquímico dos filmes de poli(4-ABA)	56
5.1.4 Avaliação da adsorção e eletroatividade dos filmes de poli(4-ABA).....	57
5.1.5 Comportamento do poli(4-ABA)/EIG em solução de ferro/ferricianeto de potássio	58
5.1.6 Análises da microscopia eletrônica de varredura	59

5.1.7 Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica	61
5.2 – Aplicação das plataformas de poli(4-ABA)/EIG na construção do biossensor ..	62
5.2.1. Construção e caracterização do RNAsensor por VPD utilizando o AM	63
5.2.2. Construção e caracterização do RNAsensor por EIE.....	67
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	75
REFERÊNCIAS	77
Apêndice A.....	83

1. INTRODUÇÃO

Diversas doenças do velho mundo que já eram conhecidas na Espanha e Portugal foram introduzidas nas Américas e no Brasil a partir dos primeiros séculos de colonização. Tais fenômenos se intensificaram com o tráfico de escravos e assim, doenças como varíola, sarampo, tuberculose se instalaram nestas colônias (VASCONCELOS, 2015). Conforme descrito por Bryant *et al.* (2007), junto com a escravidão, também se instalou a febre Amarela e o *Aedes aegypti* que é o principal transmissor de várias doenças.

Além do vírus da febre amarela, do vírus da dengue, do vírus do Nilo ocidental o *Aedes aegypti* também transmite o Zika Vírus (ZIKV). Este mosquito é somente um dos tipos daqueles que transmite essas doenças, sendo que o *Aedes africanus*, o *Aedes luteocephalus*, o *Aedes hensilli*, também podem transmitir a doença para outros seres. O ZIKV é representado por um vírus de RNA positivo de cadeia simples e que foi identificado pela primeira vez em 1947, durante uma vigilância da febre amarela em Uganda, na floresta de Zika, e seu primeiro relato se deu em humanos em 1952 (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952).

No Rio Grande do Norte, em 2015, na cidade de Natal, pacientes foram avaliados por um especialista em doenças infecciosas e os sinais e sintomas clínicos identificados não apresentavam semelhança com os sintomas observados pela infecção por Dengue ou Chikungunya. Os sinais apresentados eram basicamente dores de cabeça, conjuntivite purulenta, mialgia (dor muscular), distúrbios digestivos, além de artralgia (dor articular) e febre. Em março do mesmo ano, o Laboratório de Virologia do Instituto Carlos Chagas, da fundação Oswaldo Cruz, no Sul do Brasil, recebeu 21 amostras de soro dos pacientes com infecção aguda que correspondia aos sintomas de dengue. Após testes específicos, descartou-se a possibilidade de Dengue ou Chikungunya. Os sintomas clínicos apresentados eram compatíveis com a infecção por ZIKV. Testes específicos foram realizados e constatou-se então o primeiro surto causado pela presença de Zika vírus no nordeste do Brasil (ZANLUCA *et al.*, 2015)

Freire *et al.* (2015) abordaram a urgência da questão ao levar-se em conta duas dificuldades no combate à transmissão do ZIKV, pois a transmissão urbana dessas infecções pode englobar várias espécies de mosquitos e existe uma grande adaptabilidade do Zika vírus. Foy *et al.* (2011) relataram uma outra forma de transmissão do ZIKV que é a transmissão por vias sexuais, ressaltando assim, a dificuldade no combate a transmissão, além de propor que a via sexual de transmissão fez com que houvesse uma grande disseminação deste vírus no país.

Atualmente, não existe nenhum teste que possa ser aplicado em campo, confiável, rápido e prático para detectar a infecção congênita por ZIKV, o que faz com que os testes recomendados sejam caros, demorados e necessitem de mão de obra e equipamentos especializados. De acordo com Hayes (2009), a infecção por Zika vírus é diagnosticada por testes moleculares e sorológicos, tais como a transcrição de reação reversa em cadeia da polimerase para o RNA viral (RT-PCR) e o teste M Elisa, que é um teste M de imunoglobulina (Ig) de neutralização da redução da placa para os anticorpos do Zika vírus.

Tanto o teste molecular quanto o teste sorológico, apresentam algumas dificuldades em suas execuções. Hennessey *et al.* (2016), relataram que o RT-PCR é realizado em amostras de soro coletadas do cordão umbilical de recém-nascidos no intervalo de 2 dias após o nascimento e que placenta congelada juntamente com o líquido cefalorraquidiano, que são materiais de outros estudos, também devem ser testados por RT-PCR. Já Lanciotti *et al.* (2008), relataram que o teste (IgM) Elisa para o vírus da ZIKV e Dengue podem apresentar um falso positivo devido a presença de anticorpos de reação cruzada de outros flavivírus.

Com a finalidade de desenvolver um método de detecção preciso, rápido, de resposta em tempo real e sem a ocorrência de interferentes ou falsos positivos, foi proposto neste trabalho a construção de um biossensor para a detecção do Zika vírus, a fim de dinamizar as análises, fazendo com que o diagnóstico seja simples, de baixo custo e prático para o uso clínico.

Devido à facilidade de se obter materiais estáveis e reprodutíveis, a modificação com filmes poliméricos, principalmente os de troca-iônica, tem ganhado notoriedade nas últimas décadas, levando a uma detecção simultânea de diversos analitos de interesse. (BRUGNERA; SANTOS; ZANONI, 2006; WOOD; IROH, 1996)

Ressalta-se uma grande importância nos estudos envolvendo filmes poliméricos, pois a junção eletrodo/polímero pode ser uma combinação muito favorável ao desenvolvimento de sensores. Na subclasse dos sensores, os biossensores são dispositivos que contêm um material biológico como agente de reconhecimento. Esse material biológico que pode ser enzimas, anticorpos, antígenos, DNA ou RNA, bactérias, dentre outros, são imobilizados sobre a superfície de um transdutor, o qual converte o sinal biológico em um sinal físico ou químico (LA-SCALEA; SERRANO; GUTZ, 1999)

Esses dispositivos se apresentam como ferramentas capazes de integrar técnicas conhecidas. Essa integração se dá pelas suas características intrínsecas, tais como especificidade, seletividade, baixo custo de produção, miniaturização dos sistemas para um

monitoramento contínuo e rápido (DAVIS; HIGSON, 2005, FREIRE; DURAN; KUBOTA, 2002)

Existe uma classe especial de biossensores classificada como genossensores, que são sensores que contém como agente de reconhecimento, material genético tais como: fragmentos de DNA ou RNA, oligonucleotídeos, etc. O diagnóstico de doenças infectocontagiosas ou parasitárias é um grande exemplo da aplicação dos genossensores que são construídos para determinar e analisar sequências de bases do DNA que compõe o código genético de uma doença específica (EPSTEIN; LEE; WALT, 2002 e PIVIDORI; MERKOÇI; ALEGRET, 2000).

Neste trabalho, investigou-se o desenvolvimento de um genossensor para diagnóstico do Zika vírus (ZIKV), vista a complexidade que se tem em determinar com um diagnóstico preciso, pois os sintomas relacionados ao ZIKV se assemelham muito aos da Dengue e outras doenças. O objetivo na construção deste biossensor almeja, ainda, contribuir com um método eletroquímico com especificidade e rapidez na análise, garantindo-se assim, em poucos minutos, resposta ao paciente com relação a infecção pelo Zika vírus. Essa rapidez no diagnóstico, faz com o tratamento específico para a doença possa ser iniciado de forma mais rápida e eficiente, aumentando-se assim as chances de cura dos infectados.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 – ZIKV no mundo e no Brasil

Na década de 40, mais exatamente no ano de 1947, isolou-se pela primeira vez o vírus da ZIKV. O nome ou sentido literal pode ser traduzido para algo com o significado de “coberto” ou “cheio” e vem de uma floresta com o mesmo nome na Uganda. (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; MACNAMARA, 1954). Casos isolados em países da África foram detectados e na década de 1970 na Indonésia. Epidemias também foram observadas em ilhas do Oceano Pacífico e na Micronésia. Musso *et al.* (2014) descrevem que em fevereiro de 2014 o vírus foi registrado pela primeira vez no continente americano nos seguintes locais: no território chileno na Ilha de Páscoa decorrente do surto no oceano pacífico. Já Zanluca *et al.* (2015) descreveram a presença do vírus no Nordeste brasileiro, e Who (2016), descreveu que, em maio de 2016, um total de 57 países relataram a continuação transmissão do vírus. Destes países, 44 tiveram um surto de ZIKV documentado pela primeira vez.

A infecção por ZIKV já não pode ser considerada nova para a comunidade científica, entretanto o vírus em si era praticamente desconhecido até os atuais surtos ocorridos que mobilizaram políticas nacionais e internacionais, capturando assim a atenção internacional. Porém, essa atenção internacional não se deu pela infecção em si, mas pelo aumento da incidência de microcefalia em recém-nascidos, além da associação com outras doenças, tais como, síndrome de Guillain-Barré. Para essa doença autoimune neurológica, outras doenças transmitidas por mosquitos também têm sido associadas pelo risco aumentado do aparecimento, mas a magnitude da doença em homens e mulheres sofreu um ofuscamento pelo impacto causado em gestantes e a associação a microcefalia. Sendo assim, a epidemia do ZIKV movimentou pesquisadores, sociedade e gestores em geral para a importância da contaminação por esse vírus (GONZALEZ, 2016).

O ZIKV apresenta uma novidade para o meio científico que está envolta por algumas variáveis. Dentre elas a forma de transmissão e contágio e a relação não esclarecida entre as complicações neurológicas com o vírus. Assim, em pouco tempo desde que a doença entrou na agenda de saúde global, várias arenas de significação têm sido criadas para o entendimento e estudo dessas incógnitas, a ponto de alguns autores apontarem a Zika como uma doença de significação. (SHUM, 2016) A ideia de significação vem do conceito de Treichler (1987) no qual epidemias configuram-se como “para raios” de tensões e dinâmicas

sociais, tais como, racismo xenofobismo, culpabilização econômica, inequidade de gêneros, etc.

Inicialmente a doença foi considerada benigna e exantemática. As complicações causadas pela infecção pelo ZIKV não trouxeram muita atenção da esfera da saúde e dos políticos até o final de 2015, quando complicações neurológicas foram associadas a contaminação pelo vírus. A partir desse momento, não só no Brasil, mas mundialmente, a contaminação pelo vírus passou a ser considerada emergencial. Em novembro de 2015, declarou-se no Brasil Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional, sendo este mecanismo criado pelo Governo em 2011 (PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, 2011).

Em fevereiro de 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) veio a decretar emergência sanitária internacional. Esta figura jurídica utilizada anteriormente nos casos da gripe H1N1 (gripe suína), poliovírus (poliomielite) e do ebola, classificou a contaminação causada pelo ZIKV como uma ameaça e evento de risco. (VENTURA, 2016). Weir e Mykhalovskiy (2010) descreveram que, no contexto de securitização da saúde, em uma escala global, a declaração de emergencial por parte da OMS não está relacionada somente a perigos concretos no presente, mas também a incertezas e interesses políticos que podem ou não configurar perigos no futuro.

Dentro do aspecto de significação, tem-se também o modo de transmissão da doença. Zika, malária, dengue, chikungunya, são representados como um problema de mosquito ou de uma guerra contra mosquitos. (PIMENTA, 2015). Em 1956 a transmissão do ZIKV através de mosquitos *Aedes aegypti* para ratos e macacos foi comprovada em laboratório. Pode-se afirmar que, o *Aedes aegypti* é o principal transmissor, porém a transmissão por *Aedes africanus* foi confirmada em uma epidemia conhecida como epidemia de Yap. Já na Micronésia em 2007 a presença de *Aedes hensilli* e na Polinésia Francesa a transmissão foi carregada pelo *Aedes polynesiensis*. Recentemente o vírus foi detectado no mosquito *Aedes albopictus* (BOORMAN; PORTERFIELD, 1956; PAHO; WHO, 2016)

A partir da discussão sobre as condições ambientais, políticas e econômicas que geram e eternizam a propagação do vetor e também do vírus, a Zika, assim como a dengue, foi considerada doença negligenciada ou da pobreza. Os responsáveis que trazem à tona esta questão, também levantam questões relacionadas às mazelas de financiamento e de pesquisa, que afetam diretamente populações vulneráveis e em situações de risco (PIMENTA, 2015).

Com o intuito de agilizar o diagnóstico, avanços recentes no campo da biologia molecular juntamente da tecnologia fizeram com que a ampliação de dispositivos capazes de diagnosticar uma gama de doenças fossem desenvolvidos, podendo se tornar aparelhos

portáteis e baratos. Amplamente usados no exterior, os biossensores tem atraído a atenção dos pesquisadores brasileiros, especificamente na detecção de doenças infecciosas negligenciadas, que estão intimamente ligadas a falta de saneamento básico e a pobreza (RIBOVISK, 2017).

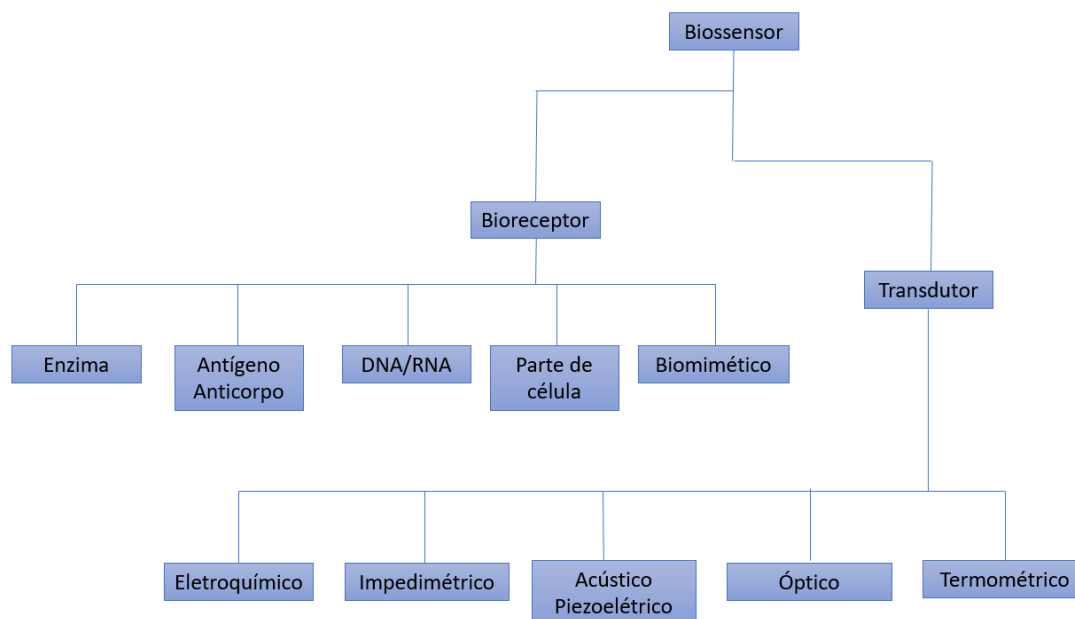
2.2 – Biossensores

Monitoramento ambiental, indústrias alimentícias e análises clínicas são alguns dos exemplos que requerem o desenvolvimento de ferramentas seletivas para a detecção de biomoléculas. Biossensores são considerados ferramentas complementárias aos métodos de análise clássicos, como, por exemplo, a cromatografia líquida, apresentando vantagens como simplicidade inerente, baixo custo de produção, rápida detecção, propensão a miniaturização, permitindo assim monitoramento contínuo. (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012). Perumal *et al.* (2014) descrevem que avanços importantes na tecnologia ocorridos na última década proporcionaram matérias e ferramentas necessárias para o avanço na construção de biossensores. Desde a primeira invenção do sensor de oxigênio de Clark, melhoras na sensibilidade, seletividade e uma multicomplexidade na capacidade de detecção dos biossensores foram aprimoradas.

Biossensores são dispositivos analíticos que incorporam um material biológico com um contato com um transdutor adequado que converte o sinal bioquímico em um sinal quantificável. Materiais biologicamente derivados (como parte de células, enzimas, fragmentos de DNA/RNA, etc) e/ou que estejam ligados a reações bioquímicas, quando intimamente associados ou integrados em um transdutor físico químico ou microssistema de transdução, são utilizados nos biossensores. Tais transduções podem ser eletroquímicas, ópticas, magnéticas, piezoelétricas ou térmicas. (SHARMA; SEHGAL e KUMAR; 2003).

Recomendações da IUPAC em 1999, definem o biossensor como: biossensor é um dispositivo, capaz de fornecer informações analíticas quantitativas ou semi-quantitativas seletivas usando um elemento de reconhecimento biológico. (THENEVOT *et al.*, 1999). A Figura 1 representa, ilustrativamente, o esquema de biossensor.

Figura 2: Classificação dos biossensores de acordo com a transdução aplicada.



Fonte: PERUMAL e HASHIM, 2013.

2.3 – Transdutores

No que tange o desenvolvimento dos biossensores, a eletroquímica tem sido uma área de grande interesse e muito aplicada, esse interesse é devido à diversidade de técnicas, além de diversos materiais que podem ser utilizados como transdutores. Em conjunto com essa diversidade, vale ressaltar a facilidade na construção e de mensuração obtida através das técnicas empregadas. Uma gama de materiais podem ser empregados na construção dos eletrodos para o desenvolvimento de tais dispositivos, tais como: platina, ouro, carbono grafite, carbono vítreo, pasta de carbono, grafeno, além de eletrodos modificados como, por exemplo, eletrodo de carbono com azul da Prússia, com nanotubos de carbono, com nanopartículas, dentre outros. Acompanhando uma tendência dos estudos contemporâneos, a etapa conhecida como miniaturização dos sistemas eletroquímicos se estabelece nas áreas de fronteira das pesquisas. Mesmo que o estudo com eletrodos de dimensões micrométricas seja relatado desde a década de 40, no qual o principal objetivo naquela época era a medição da concentração de oxigênio em tecidos de organismos vivos (DAVIES, BRINK JR, 1942).

No atual panorama da eletroanalítica, uma justificativa para a miniaturização inclui o avanço de tecnologias que proporcionam a fabricação de eletrodos em escala micrométrica a preços relativamente baixos, com uma sensibilidade dos resultados obtidos não comprometida pela redução do tamanho dos sensores, uma vez que a reação ocorre na

região interfacial eletrodo/solução, portanto não dependendo do volume da amostra (SIUZDAK, 1996).

Para adequar-se à medida de interesse do analito a ser detectado, os transdutores podem sofrer variações quanto a forma e função. A função do transdutor é receber as perturbações biocatalíticas sofridas durante o processo de interação receptor/analito e converter esse sinal em um sinal mensurável, podendo este ser físico ou químico e ser armazenado, visualizado ou amplificado, sendo que característica da transdução de sinal está intimamente ligada à característica do produto gerado (ou não) pelo componente biológico (ADHIKARI; MAJUMDAR, 2004; D'ORAZIO, 2003; MELO; KUBOTA, 2002).

Luong *et al.* (2008) abordam que o sistema de transdução deve ser correspondente com a característica da interação bioquímica das espécies em estudo. Portanto, Andrade (2006) e Soares (2011) descrevem que, de acordo com o princípio de energia envolvida na transdução, pode-se classificar os transdutores da seguinte maneira:

- ✓ Eletroquímicos: ao classificar-se os transdutores como eletroquímicos, obtém-se uma subdivisão em amperométricos, potenciométricos e condutimétricos. Os transdutores amperométricos convertem o sinal biológico/bioquímico em corrente elétrica. Os transdutores condutimétricos convertem o sinal biológico/bioquímico em potencial elétrico e os transdutores condutimétricos modificam a condutividade elétrica do substrato formado/consumido nas reações bioquímicas.
- ✓ Impedimétricos: têm seu princípio fundamentado na aplicação de uma pequena perturbação senoidal em potencial a uma dada faixa de frequências seguida da obtenção da resposta do sistema em corrente elétrica.
- ✓ Calorimétricos: Os transdutores calorimétricos detectam a entalpia de reação do substrato formado/consumido nas reações bioquímicas.
- ✓ Acústicos ou piezoelétricos: Esse tipo de transdutor está ligado a variação da frequência de cristais piezoelétricos com variações de massa.
- ✓ Ópticos: Os transdutores ópticos detectam uma mudança no caminho óptico ou uma alteração de absorbância relacionada com a presença/falta do analito.

- ✓ Termométricos: Os transdutores termométricos ao detectarem um analito geram uma variação de temperatura.

De acordo com as propriedades eletroquímicas presentes nas biomoléculas as detecções são realizadas. Essas detecções são detectadas através das medidas de corrente e potencial gerados pela presença de grupamentos oxidáveis nas estruturas dos compostos biológicos.

Isa e colaboradores (2010) afirmam que as biomoléculas podem ser oxidadas ou reduzidas utilizando como, por exemplo, voltametria de pulso, onde se aplica uma faixa de potencial e a corrente é medida proporcionalmente à concentração do componente que se tem interesse. Como outro exemplo, pode-se realizar uma amperometria ao conhecer-se o sistema, aplica-se um potencial fixo (diferentemente da voltametria no qual a faixa de potencial é variada) e como resultado tem-se a medição da corrente diretamente em função do tempo, sendo este tipo de biossensor largamente utilizado como transdutor eletroquímico. (WANG; 1999)

Se o composto de interesse apresenta grupos redox em sua estrutura, ou seja, grupos oxidáveis ou reduzíveis, a voltametria cíclica pode ser aplicada como um ciclo, tanto anódico quanto catódico. Na voltametria de pulso uma faixa de potencial é utilizada, porém a presença de ciclos permite o estudo das regiões redox dos compostos.

Um dos passos mais importantes na construção de um biossensor é a definição do receptor, que tem como função interagir de forma específica com o analito, gerando assim alterações em um ou mais parâmetros físico-químicos. Os receptores biológicos podem ser enzimas, fragmentos de DNA/RNA, anticorpo, organela, uma célula viva e também microrganismos. A interação específica entre o analito e o receptor podem produzir íons, elétrons, luz, etc. Sendo assim, os receptores são os responsáveis pelo reconhecimento do analito a ser estudado e também pela sensibilidade/especificidade do biossensor. (VO-DINH; CULLUM, 2000)

2.4 – Receptores

O bioreceptor ou elemento de reconhecimento biológico causa bastante distinção entre os biossensores. O bioreceptor realiza a interação entre o sistema de reconhecimento de um sensor com seu analito. Sendo assim, é crucial que o bioreceptor seja seletivo e sensível

ao analito de interesse, prevenindo interferências de outros componentes presentes na amostra em estudo (LOWE, 2007).

Todo elemento vivo ou derivado de um elemento vivo que possa ser imobilizado em contato com a superfície de um sensor é considerado um biocomponente. Atuando como espécies de interesse tem-se: enzimas, tecidos, antígenos/anticorpos, fragmentos de DNA/RNA, monocamada fosfolipídicas e outros (WANG, 1999).

Considerada a etapa mais importante na construção de um biossensor, a imobilização da biomolécula é de suma importância pois é a atividade bioquímica intrínseca do composto a ser imobilizado deve ser mantido a fim de que o reconhecimento com o analito se dê em seu grau máximo. O processo pelo qual o componente biológico se liga ao biossensor é chamado de imobilização, é de grande importância neste processo que o composto mantenha suas propriedades biológicas naturais (SETHI, 1994).

2.4.1 Genossensores

A classificação dos biossensores é feita através do elemento utilizado como bioreceptor, tais como enzima, antígeno/anticorpo, fragmentos genéticos, células inteiras, etc. Dentro da classificação dos biossensores existem os chamados genossensores, que são conhecidos como biossensores de DNA/RNA. O que caracteriza um genossensor além da alta seletividade são as interações específicas que ocorrem entre as bases nitrogenadas presentes na molécula de DNA. Geralmente os genossensores são constituídos dos produtos de um PCR (*Polymerase Chain Reaction*) chamados de oligonucleotídeos, ou fragmentos de DNA/RNA imobilizados sobre a superfície de eletrodos modificados (WANG, 2002).

Existem vários métodos descritos na literatura sobre a detecção da imobilização da sonda e do alvo sobre a superfície de eletrodos. Esses métodos podem ser diretos ou indiretos, sendo que a sonda, fita simples do DNA (ssDNA), após entrar em contato com o alvo complementar, reconstitui a dupla fita do DNA (dsDNA). Este processo é chamado de hibridização. Tal processo pode ser monitorado de forma direta, oxidando e reduzindo as bases nitrogenadas da molécula de DNA, ou de forma indireta, com o auxílio de intercaladores e/ou indicadores, tais como, azul de metileno, brometo de etídio, dentre outros (LIU et al., 1996; ZHU et al., 2004).

Os intercaladores de fita simples e de fita dupla com azul de metileno e brometo de etídio auxiliam de forma significativa no reconhecimento dos eventos de hibridização. O azul de metileno interage através de interações eletrostáticas, se intercalando diretamente na

dupla fita, porém apresenta uma interação preferencial às bases nitrogenadas guanina livres na fita simples de DNA (YANG et al., 2002; LIU, LI, DONG, 1996). Sendo assim, uma diminuição no sinal da corrente após o evento de hibridização é observada, devido a um bloqueio das guaninas livres que tem preferência em se ligar a citosinas. Já o brometo de etídio tem um efeito contrário, ele se interage preferencialmente a dupla fita do DNA, isso se dá pelo efeito intercalante do composto sobre o DNA helicoidal, se alocando preferencialmente entre os pares de base da estrutura enovelada, sendo também promissor na detecção indireta do evento de hibridização.

Os genossensores tem a capacidade de detectar genes específicos ou genes mutantes que estão ligados diretamente a doenças humanas hereditárias (MARAZZA et al., 2001). Existe estudos intensos na identificação de genes associados a doenças e seus respectivos estágios, sendo essa atividade de grande importância (BLOHM, GUISEPPI, 2011).

Silva (2004) descreve sobre a importância da identificação das diversas mutações pelas desordens genéticas herdadas. Ainda discorre sobre quão importante é decifrar a estrutura organizacional e a sequência de moléculas do DNA. Essas descobertas colaboram com o desenvolvimento de aplicações importantes tais como diagnóstico clínico de diversas doenças, desenvolvimento e pesquisa de novas drogas, tecnologia de alimentos, assim como terapia gênica, ciências ambientais e forenses. Portanto os biossensores baseados em material genético (genossensores) oferecem a promissora função de obtenção de informações de sequências específicas de uma forma mais barata e rápida, além de diagnósticos de doenças genéticas, podendo oferecer também, informações sobre doenças infecciosas. Tais vantagens se tornam mais relevantes quando se comparado aos ensaios tradicionais de maior uso para a identificação do evento de hibridização.

Sendo assim, os genossensores tem sido aplicados na área de eletroanalítica tanto para a investigação de novas doenças e também na investigação de diagnósticos que demandam uma análise genômica. Wang (2002) cita que os casos de doenças terminais apresentou um aumento significativo e que existe pouco sucesso na detecção dos estágios iniciais dessas doenças, sendo que uma detecção rápida e barata contribuiria para aumentar as possibilidades de cura. Diante de todo o contexto torna-se imprescindível o surgimento de propostas de detecção que andem juntamente com as propostas de cura, que garantam características como especificidade, sensibilidade, rapidez de análise e baixo custo.

2.5 – Técnicas de imobilização

Várias técnicas estão disponíveis para a imobilização de biomoléculas, mas nem sempre são aplicáveis para a construção de biossensores. (SHARMA; 2003).

A imobilização da camada de reconhecimento é a etapa mais crítica e importante na construção de um biossensor. No caso de sensores enzimáticos a presença de interferentes como metais faz com que o sítio ativo da enzima realize uma interação com o metal e não com o analito de interesse, causando assim uma inativação do sistema catalítico. Outros fatores tais como meios não específicos (meio intracelular por exemplo) faz com que a enzima imobilizada apresente um menor grau de atividade, levando assim a uma diminuição do sinal analítico a ser medido. Pode-se citar ainda pH, temperatura, força iônica do meio dentre outros fatores que podem conferir diferentes formas de seletividade e sensibilidade ao biossensor. (KARYAKIN et al., 1999).

O uso de nanomateriais, tais como, nanopartículas, nanotubos de carbonos, polímeros condutores para o design de dispositivos biossensíveis constituem uma excitante e recente abordagem para melhorar a performance das plataformas de detecção. Os materiais mais promissores são os nanomateriais devido às suas propriedades únicas, por exemplo, as propriedades elétricas, mecânicas e estruturais presentes nos nanotubos de carbono (WANG, 2005a). Os nanomateriais podem realçar a reatividade eletroquímica das biomoléculas e podem promover a reações de transferência de elétrons em proteínas. Nanopartículas de diferentes tamanhos e composições têm sido amplamente utilizadas como marcadores sensíveis na transdução eletrônica, óptica e microgravimétrica em diferentes eventos de reconhecimento biomolecular (WANG, 2005b).

Luo *et al.* (2006) e Pingarron *et al.* (2008) descrevem a excelente condutividade das nanopartículas de metais permitem realçar a transferência de elétrons entre os centros redox das proteínas na superfície dos eletrodos. As técnicas de imobilização para o desenvolvimento de biossensores específicos são classificadas como físicas ou químicas, dentre as químicas, pode-se citar: as ligações covalentes e as ligações cruzadas (*cross-linking*), dentre as físicas, temos: a oclusão (*entrapment*) e a adsorção física (LEI, 2006). Estas técnicas estão descritas, em maiores detalhes, a seguir.

- ✓ Adsorção física: A técnica conhecida como adsorção física retém a biomolécula que servirá como bioreceptor nas proximidades da superfície do transdutor, essa interação é de caráter físico entre a biomolécula e a matriz que pode ou não ser polimérica.

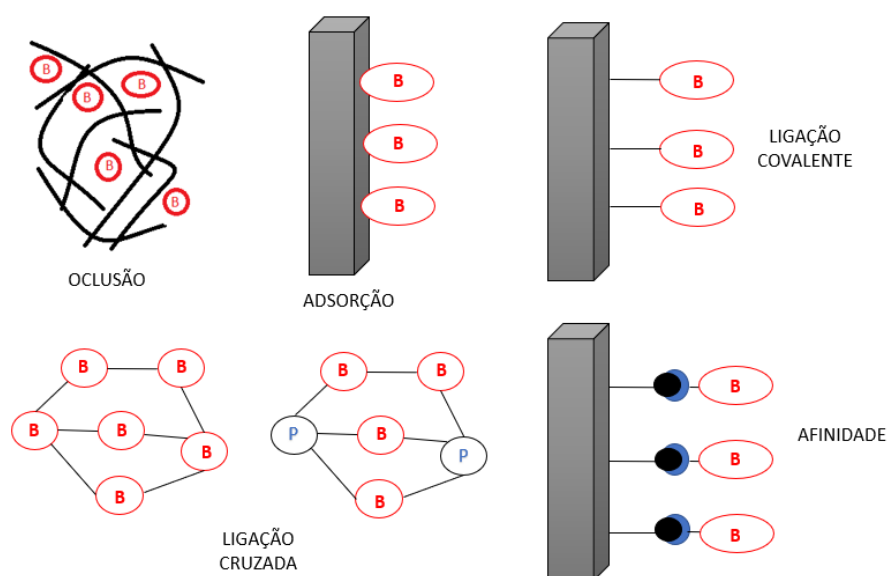
(SINGH, 2008) As interações do tipo de Van der Waals ou eletrostática, ligações de hidrogênio ou dipolo-dipolo podem ocorrer quando há interação da biomolécula com a matriz por meio da parte hidrofóbica de sua estrutura. A adsorção física apresenta algumas vantagens, tais como: não existe a necessidade da inserção de reagentes para a imobilização da biomolécula, além de manter a integridade do composto, pois o mesmo pode ser regenerado. Apesar da técnica não apresentar complexidades de operação, apresenta desvantagens pois sofrem mudanças em relação a alguns fatores, tais como: pH, força iônica e temperatura, além da não garantia de que o material imobilizado esteja presente podendo implicar falta de reprodutibilidade entre os sistemas. (SILVA, 2004; VIEIRA, 2011).

- ✓ **Oclusão:** A oclusão pode ser definida como o “aprisionamento” do componente biológico sobre o produto de modificação do eletrodo, no caso da eletropolimerização, na mesma solução que está o monômero a ser eletropolimerizado, está também a biomolécula, neste processo, a biomolécula fica presa dentro do polímero formado, sem uma reação química paralela que possa afetar a atividade do material biológico aprisionado. Uma vantagem da aplicação desta técnica é consegue-se ter ao mesmo tempo a eletropolimerização e a imobilização da biomolécula sobre superfícies de eletrodos que apresentem uma geometria complexa, além de técnicas fáceis de aplicação e de baixo custo. Como desvantagem a técnica de oclusão pode apresentar perda da atividade biomolecular pela formação de radicais livres além da formação de uma alta barreira difusional. (SOARES, 2011; VIEIRA, 2011).
- ✓ **Ligação covalente:** Esta técnica de imobilização de biomoléculas se dá através da interação entre os grupos funcionais do material biológico de interesse na imobilização e a matriz suporte, na maioria dos casos, sob o eletrodo modificado. Uma vantagem da ligação covalente é que pode-se usar como matriz suporte, filmes poliméricos que foram eletrogerados sob condições extremas tais como: solvente orgânico, altos/baixos valores de pH, potenciais elevados para que se inicie a eletropolimerização através da formação de íon radicais, etc. Estas condições normalmente causariam danos a biomolécula levando a uma perda de atividade da mesma. Outra vantagem apresentada pela ligação covalente é que a interação entre a biomolécula e o polímero funcionalizado pode ser feita através de soluções tampão, que podem conter ou não aditivos ou estabilizadores que mantém a atividade catalítica do material a ser

imobilizado e/ou as características de reconhecimento intrínsecas de cada biomolécula. Como desvantagem é válido citar que a matriz de suporte não é regenerável. (SOARES, 2011; VIEIRA, 2011).

- ✓ **Ligação cruzada:** A imobilização através de ligações cruzadas se dá como um resultado da reação da biomolécula com algum componente bifuncional, nesta reação se observa a formação de ligações covalentes intermoleculares. A escolha do composto da ligação cruzada é realizada de acordo com os grupos funcionais presentes na biomolécula, sendo assim, esta técnica requer o uso de agentes bifuncionais como por exemplo o glutaraldeído, que contém grupos reativos terminais, que poderão interagir com outros grupos funcionais, por exemplo: as amins de algumas biomoléculas (receptores) ou agentes multifuncionais, como o hexameileno diisocianato. (GIL; KUBOTA e YAMANOTO; 2014). As principal desvantagem do método está na baixa retenção da atividade do material biológico e baixa estabilidade mecânica, levando a dificuldades de aplicações industrialmente além de pouca reprodutibilidade. As principais técnicas de imobilização estão representadas na Figura 3.

Figura 3: Esquema representativo das principais técnicas de imobilização de biomoléculas utilizadas na construção de biossensores.



Fonte: SASSOLAS; BLUM; BOUVIER, 2012.

2.6 – Polímeros condutores aplicados em biossensores

Gomes (2011) define a palavra polímero como composto com elevada massa molecular que são constituídos pela junção de unidades químicas, a origem do nome vem da junção de duas palavras gregas, a palavra poli que significa “muitos” e meros que significa “partes”. Os polímeros são considerados macromoléculas pela alta massa molar, podendo ser orgânicos ou inorgânicos. São conhecidas como monômero a parte que dá início as reações de polimerização, pois mono significa “uma” e mero “parte”. Existem vários tipos de polímeros e estes podem ser constituídos apenas de um monômero no qual são considerados homopolímeros, os copolímeros são os polímeros constituídos de meros distintos dentro da cadeia polimérica e por fim podem ser sintéticos ou de origem animal.

Relaciona-se o pensamento e a aplicação de polímeros a uma certa característica, que é a característica de isolamento, ou tem-se a ideia de aplicação como isolantes. De fato, há pouco tempo atrás, toda condutividade elétrica nos polímeros (principalmente devido aos íons fracamente ligados) era considerada como um fenômeno indesejado. Apesar da condutividade iônica dos eletrólitos poliméricos (solventes macromoleculares contendo íons de baixa massa molar) e polieletrólitos (macromoléculas contendo grupos ionizáveis) serem utilizados largamente em sistemas eletroquímicos nas últimas décadas, o aparecimento de polímeros condutores resultou em uma mudança pragmática em abriu novos horizontes tanto para a física quanto para a química. (INZELT, 2012).

A partir da década de 70, um novo grupo de polímeros possuindo uma alta condutividade eletrônica (polímeros eletroquimicamente condutores) estando no estado oxidado ou reduzido foram descobertos. Allan J. Heeger, Alan G. MacDiarmid e Hideki Shirakawa desempenharam um papel importante nessa descoberta e assim receberam em 2000 o prêmio Nobel da química pela descoberta e desenvolvimento dos polímeros eletronicamente condutores (SHIRAKAWA et al., 1977; INZELT, 2012).

Além da condutividade elétrica existem outras propriedades que viabilizam a aplicação dos polímeros condutores em um amplo campo de aplicações trazendo a estes materiais um potencial tecnológico vasto. Sendo assim, a utilização dos polímeros eletroativos para modificação das superfícies dos eletrodos foi um passo importante para o desenvolvimento de biossensores, devido as vantagens particulares pertencentes a este grupo de material. (PEREIRA, 2003).

Guimard e colaboradores (2007) citam que a pesquisa na área de polímeros condutores para aplicações biomédicas teve um grande salto a partir dos anos 80, pois estes

materiais são compatíveis com as macromoléculas biológicas. Como vantagens é possível citar a facilidade de síntese, baixo custo e propriedades versáteis. Dentro da síntese, os polímeros condutores apresentam outra vantagem que é a deposição de filmes finos sobre a superfície dos eletrodos, fazendo com que a interação transdutor/biomolécula seja aumentada (HANSEN, 2011). Levando em consideração o aperfeiçoamento dos biossensores, a descoberta das vantagens proporcionadas pelos polímeros condutores auxilia na imobilização do elemento biológico sobre a superfície do eletrodo, aumentando a conversão do sinal biológico em sinal elétrico a partir das propriedades condutoras, além de aumentar a seletividade, estabilidade e velocidade de reconhecimento (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; MALHOTRA; CHAUBEY; SINGH, 2006).

Sadki e colaboradores (2000) descrevem que os monômeros geralmente utilizados para formação de filmes poliméricos condutores comumente são compostos aromáticos, pois estes compostos apresentam uma facilidade de serem oxidados a cátions radicais estáveis durante o processo de eletropolimerização, levando a uma larga utilização deste tipo de material para a modificação de eletrodos e criação de novos biossensores nas últimas décadas.

A modificação da superfície de eletrodos também é obtida a partir de polímeros funcionalizados no qual se extrai diversas aplicações, dentre elas, a incorporação de biomoléculas. Assim, esse tipo de modificação tem atraído muito o interesse como matriz apropriada para a construção de biossensores, pois fornecem uma boa detecção e respostas mais rápidas do sistema em análise, fazendo com que o transdutor se torne mais sensível e seletivo, melhorando também a eficácia de fixação/estabilização das biomoléculas. (SANTOS, 2014)

Como os biossensores apresentam todas as características antes citadas, essa ferramenta de análise torna-se eficaz na detecção de várias doenças específicas. Neste sentido propõe-se o desenvolvimento de um biossensor para detecção de zika vírus através de uma plataforma modificada com o polímero derivado do ácido 4-aminobenzóico, com uma detecção impedimétrica do oligonucleotídeo P1 imobilizado sobre a plataforma funcionalizada. Propõe-se também o reconhecimento do evento de hibridização assim como um estudo da estabilidade do biossensor proposto.

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Desenvolver um genossensor com detecção eletroquímica para o Zika vírus. Para isto, pretende-se, realizar a modificação de eletrodos impressos de grafite com filmes poliméricos provenientes do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), e, sobre estas plataformas eletroquímicas funcionalizadas, imobilizar um oligonucleotídeo específico contendo 35 pares de base para reconhecimento do RNA do Zika vírus, visando-se assim a detecção do vírus em amostras de soro sanguíneo de pacientes contaminados.

3.2 – Objetivos específicos

- ✓ Eletropolimerizar o ácido 4-aminobenzóico sobre eletrodos impressos de grafite (EIG) utilizando a técnica de Voltametria Cíclica (VC);
- ✓ Caracterizar, eletroquimicamente, os eletrodos modificados, utilizando-se as técnicas de Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE);
- ✓ Avaliar por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) a superfície dos eletrodos modificados e não modificados;
- ✓ Avaliar a eficiência da plataforma na imobilização do oligonucleotídeo (5'-AAT CAA AGC CTG AGC TCC AGG CTC TCT CTG GGA CT-3'), bem como avaliar o reconhecimento do RNA viral através deste fragmento genético;
- ✓ Otimização as condições de imobilização do oligonucleotídeo sobre a plataforma proposta, assim como a detecção do reconhecimento do RNA viral através da técnica de EIE;
- ✓ Realizar os testes de reconhecimento de alvos positivos em amostras de soro sanguíneo para pacientes diagnosticados com Zika, e também em amostras de pacientes saudáveis.

- ✓ Avaliar a estabilidade do biossensor sob condições de armazenamento.

4. METODOLOGIA

4.1. Procedimento Experimental

4.1.1 – Eletropolimerização do 4-ABA

Todos os eletrodos, antes da eletropolimerização do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), foram analisados em solução de ácido perclórico (HClO_4) e em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$). Esse procedimento teve por objetivo a verificação da eletroatividade dos eletrodos e pré-condicionamento dos mesmos. Desta forma, os eletrodos foram imersos em solução de HClO_4 e 3 ciclos consecutivos de potencial, na faixa de -0,20 a +1,20 V foram realizados. Em seguida os eletrodos foram lavados com água destilada e secos sob fluxo de $\text{N}_{2(\text{g})}$, sendo então, analisados em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, na faixa de potencial de -0,25 a +0,85 V.

A eletrogeração do poli(4-ABA) foi realizada através da técnica de voltametria cíclica, utilizando 10 ciclos de potencial em velocidade de varredura de 50 mV/s, na faixa de potencial de -0,20 V a +1,20 V em solução monomérica de concentração 2,50 mM tendo como eletrólito suporte uma solução de HClO_4 0,50 M. Após a eletropolimerização, os eletrodos modificados foram lavados com água destilada em abundância e secos sob fluxo de $\text{N}_{2(\text{g})}$.

Após realizar a eletropolimerização, os eletrodos modificados foram analisados em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, na faixa de potencial de -0,25 a +0,85 V, e em solução de HClO_4 na faixa de -0,20 a +1,20 V, a fim de se investigar a modificação do eletrodo e o comportamento eletroquímico do filme polimérico adsorvido.

4.1.2 – Medidas de microscopia eletrônica de varredura

Análises morfológicas da superfície dos eletrodos antes e pós modificação com o filme polimérico derivado do poli(4-ABA), foram avaliadas pela técnica de MEV, utilizando-se um equipamento Hitachi High Technologies, modelo TM-3000. As amostras foram submetidas a ampliações de 100x, 200x, 250x, 500x, 1kx, 5kx e 20kx. Análises comparativas entre a adsorção do filme e características apresentadas pelos processos de polimerização foram analisadas através das imagens providas pelo equipamento.

4.1.3 – Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

Os espectros de impedância eletroquímica para os eletrodos impressos de grafite modificados com o poli(4-ABA) (poli(4-ABA)/EIG) e, aqueles contendo o oligonucleotídeo imobilizado (RNA sensor), foram obtidos em solução 5,0 mM de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ contendo KCl 0,1M com a finalidade de investigar as propriedades elétricas superficiais dos eletrodos. O intervalo de frequência investigado foi de 10MHz a 10 mHz, com uma amplitude de excitação senoidal de 10 mV no potencial de circuito aberto (OCP) do sistema.

4.1.4 – Construção, caracterização e estabilidade do RNA sensor

Antes da imobilização do oligonucleotídeo, obteve-se a linha base para cada eletrodo modificado. Os registros da linha base foram adquiridos para fins de estabilização do poli(4-ABA)/EIG na presença do tampão fosfato (0,1M pH 7,4). Utilizou-se a voltametria de pulso diferencial (VPD) e 10 ciclos de varreduras consecutivas de potencial. Após esta etapa, os eletrodos foram retirados da solução e secos em fluxo de $N_{2(g)}$ ultrapuro.

O processo de imobilização do oligonucleotídeo (35 pb) foi realizado através do gotejamento de 20 μ L da solução deste, em diferentes concentrações obtidas a partir da solução inicial de 200 μ M, diretamente sobre a superfície do poli(4-ABA)/EIG, uma vez que esta quantidade foi suficiente para total recobrimento da superfície do transdutor. Manteve-se o eletrodo em repouso por 20 minutos em estufa a 43 °C. Retirou-se o eletrodo da estufa e então lavou-se o mesmo em solução de tampão fosfato, sob agitação constante, para possível remoção de adsorções não específicas. Após este passo o eletrodo foi novamente seco em fluxo de $N_{2(g)}$ ultrapuro.

O evento de reconhecimento do RNA viral foi realizado adicionando-se 20 μ L da amostra de soro de pacientes diagnosticados com Zika aquecidos a 73°C, diluídos em proporções de 1:10, 1:100 e 1:1000 diretamente sobre o biossensor, para fins de interação entre o oligonucleotídeo e RNA viral. Novamente, manteve-se o eletrodo a 43 °C por 20 minutos, realizou-se o processo de lavagem em tampão fosfato e posterior secagem com $N_{2(g)}$.

O intercalador azul de metileno (AM) foi colocado sobre a superfície do biossensor. Especificamente um volume de 20 μ L de solução 5,0 mM de AM foi adicionado. Os biossensores na ausência (sonda) e presença do RNA viral (alvo) foram deixados em contato com o intercalador por 5 minutos. Após este passo, lavou-se o eletrodo em tampão fosfato e secou-se em fluxo de $N_{2(g)}$.

A eletroatividade do intercalador foi monitorada através da redução do AM sobre a superfície do biossensor contendo a sonda e alvo. Realizou-se uma varredura de potencial na faixa de +0,40 a -0,80 V, através da técnica de VPD, com os seguintes parâmetros: 25 mV; período do pulso: 0,20 s; altura do pulso: 0,06 s; velocidade de varredura: 20 mV/s.

Como técnica complementar utilizou-se a EIE para avaliar a superfície do EIG, poli(4-ABA)/EIG e RNAsensor (sonda e alvo). As análises foram realizadas no intervalo de frequência de 10MHz a 10 mHz aplicando-se o OCP, e uma amplitude de excitação senoidal de 10 mV.

A estabilidade do RNAsensor foi monitorada por 90 dias através da EIE. O eletrodo foi acondicionado em uma temperatura de 10 °C e medidas de EIE, nas mesmas condições acima mencionadas, foram obtidas durante este período.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com Ferreira e colaboradores (2015), uma boa estabilidade e interação com materiais biológicos já foi observada para o poli (4-ABA). Estudos da eletropolimerização do ácido 4-aminobenzóico foram apresentados através de duas técnicas distintas, sendo elas: VC e Cronoamperometria (CA). Assim, a imobilização e detecção das bases adenina e guanina sobre plataformas modificadas com o poli(4-ABA) foi avaliada, logo após estudos com uma sequência de pares de bases maior foi apresentada (solução PoliGA (63 μ M): os oligonucleotídeos sintéticos de poliGA foram obtidos como pó liofilizados da Invitrogen®, contendo a seguinte sequência com 16 pares de base: 5'-GGG GGG GGA AAA AAA A-3 e solução PoliCT (126 μ M): os oligonucleotídeos sintéticos de poliCT foram obtidos como pó liofilizados da Invitrogen®, contendo a seguinte sequência com 16 pares de base: 3'-CCC CCC CCT TTT TTT T-5')garantindo assim que a interação do filme polimérico com materiais biológicas fossem assegurados. Por fim, Ferreira e colaboradores (2015), demonstraram a aplicação desta plataforma na construção de biossensor para imobilização e estudos das interações entre o peptídeo DDK (sonda), com o fosfolipídio POPC (alvo específico) e o fosfolipídio POPC + colesterol 43% (alvo não específico).

Com base nestes estudos, que demonstraram a boa aplicabilidade de uso das plataformas de poli(4-ABA) na imobilização de biomoléculas, este trabalho também buscou utilizar tais plataformas para imobilização de uma sequência de oligonucleotídeos (35 pb), e posterior reconhecimento do RNA viral do Zika vírus. Contudo, neste trabalho, tanto a formação do filme polimérico quanto a imobilização do material biológico foram realizadas sobre eletrodos impressos de grafite.

Foram isoladas duas partes do genoma do ZIKV, uma parte específica em um genoma é representada por uma sequência numérica, as sequências 5631-5665 e 10519-10551 do genoma do ZIKV são representadas pelas seguintes sequências:

P1 5631-5665 AAT CAA AGC CTG AGC TCC AGG CTC TCT CTG GGA CT

P2 10519-10551 GAC TCA GTG TCC TCT GAG GGG CTC ACA GGC AGC

As amostras foram extraídas de um pool viral de zika vírus, ou seja, RNA viral de ZIKV multiplicado em laboratório. As informações sobre as sequencias utilizada pode ser

verificada no site da *Eurofins Genomics*¹, na qual foi extraída as Tabelas 1 e 2 com as características físico-químicas destas sequencias.

Tabela 1: Parâmetros relativos à sequência P1 5631-5665 do genoma do ZIKV.

Sequência (5' -> 3'):	(AAU CAA AGC CUG AGC UCC AGG CUC UCU CUG GGA CU)
Complemento reverso (5' -> 3'):	(AGU CCC AGA GAG AGC CUG GAG CUC AGG CUU UGA UU)
Sequência reversa (5' -> 3'):	(UCA GGG UCU CUC UCG GAC CUC GAG UCC GAA ACU AA)
Sequência complementar (5' -> 3')	(UUA GUU UCG GAC UCG AGG UCC GAG AGA GAC CCU GA)
Composição da sequência:	A x 8, C x 11, G x 8, T x 0, U x 8, Wobbles x 0
GC / %	54,3
Temperatura de fusão / °C	73
Coeficiente de extinção / L mol ⁻¹ cm ⁻¹	353.975,00
Comprimento	35 meros
Massa Molar / g mol ⁻¹	11.139,74

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos relativos à sequência P2 10519-10551 do genoma do ZIKV.

Sequência (5' -> 3'):	(GAC UCA GUG UCC UCU GAG GGG CUC ACA GGC AGC)
Complemento reverso (5' -> 3'):	(GCU GCC UGU GAG CCC CUC AGA GGA CAC UGA GUC)
Sequência reversa (5' -> 3'):	(CGA CGG ACA CUC GGG GAG UCU CCU GUG ACU CAG)
Sequência complementar (5' -> 3')	(CUG AGU CAC AGG AGA CUC CCC GAG UGU CCG UCG)
Composição da sequência:	A x 6, C x 10, G x 11, T x 0, U x 6, Wobbles x 0
GC / %	63,6

¹ Disponível em: <https://www.eurofinsgenomics.com/en/home/>

Temperatura de fusão / °C	75,7
Coeficiente de extinção / L mol ⁻¹ cm ⁻¹	330.850,00
Comprimento	33 meros
Massa Molar / g mol ⁻¹	10.599,43

Todo o trabalho foi desenvolvido com base na sequência P1, por questão de diminuir o número de variáveis a serem consideradas no estudo, tais como variações da sonda, do monômero, do número de ciclos da eletropolimerização, do tempo de adsorção.

Para a modificação do eletrodo utilizou-se técnicas eletroquímicas conduzidas em meio aquoso. Para formação, caracterização do filme polimérico formado e posterior avaliação do biossensor proposto foram utilizadas as técnicas de VC, VPD e EIE. Todos os resultados obtidos encontram-se descritos e discutidos a seguir.

5.1 - Estudo das características do poli(4-ABA) sob EIG

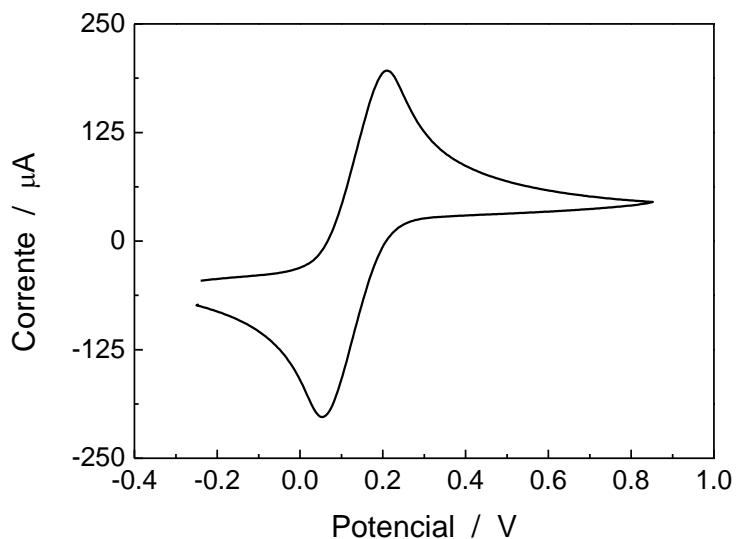
5.1.1 - Avaliação e condicionamento dos eletrodos impressos de grafite

Dentro da química analítica, a confiabilidade e reprodutibilidade dos sistemas estudados é algo de extrema importância. Assim, para fins de desenvolvimento e aplicação de um biossensor, os EIG devem apresentar respostas semelhantes perante as mesmas análises químicas. Portanto, antes do processo de eletropolimerização foi necessário o condicionamento destes eletrodos.

Para a escolha dos eletrodos impressos a serem utilizados, avaliou-se o comportamento eletroquímico dos mesmos em solução aquosa do par redox K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ 5,0 mM contendo KCl 0,10 M como eletrólito suporte. A bibliografia referente a esse par redox reporta um comportamento eletroquímico amplamente conhecido, comportando-se então como um padrão confiável a ser utilizado para o condicionamento dos eletrodos de grafite (BARD; FAULKNER; 1980)

Ao se comparar um eletrodo em relação a outro, a área eletroquimicamente ativa de 12,56 mm² do eletrodo de grafite é o principal parâmetro utilizado, uma vez que a velocidade de varredura, concentração das espécies em solução, coeficiente de difusão das espécies não variam. A Figura 4 apresenta o VC do eletrodo de grafite não modificado, na qual pode ser observada um comportamento padrão para o par redox, com ΔE de 156,11 mV.

Figura 4: VC do EIG em solução $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. $v = 100$ mV/s.



É possível afirmar que a reprodutibilidade da superfície dos eletrodos impressos apresentada é adequada para a realização dos experimentos eletroquímicos, pois a diferença de potencial entre os picos catódicos e anódicos é próxima de 150 mV. Além disso, um valor próximo de 1 foi encontrado para a razão das correntes de pico catódica e anódica (I_{pa}/I_{pc}) (SHIRAKAWA et al., 1977)

Sabe-se que o trabalho de Marcus (1956) que corresponde a essência da teoria microscópica da transferência de elétrons, considera a influência das forças moleculares estruturais e ambientais na formulação da teoria microscópica da transferência de elétrons que descreve o mecanismo da cinética de transferência eletrônica (TE) (BARD, 1980).

A fundamentação dessa teoria se baseia na reorientação das coordenadas nucleares e a reorganização da camada de solvatação (moléculas de solvente que compõe a vizinhança das moléculas de reagente) como geradoras da parte da energia de ativação, energia necessária para que o elétron transpasse a barreira energética entre os estados (HENSTRIDGE et al., 2012; MARCUS, 1993). Assim, Marcus (1993) descreveu que a energia de ativação quântica, formando assim o complexo ativado e posteriormente os produtos está relacionada a um termo central no qual foi chamado de energia de reorganização (λ) sendo que:

$$EA = \frac{(\Delta G^o + \lambda)^2}{4\lambda}$$

onde: ΔG^o é a energia livre de Gibbs padrão e EA é a energia de ativação.

Este trabalho considerou, a priori, uma suposição criada por Bill Libby em um simpósio de físico-química em 1952. Foi constatado por Bill Libby que ao ocorrer uma reação de transferência de elétrons entre íons redox, por exemplo $[Fe(CN)_6]^{3-} + e^- \rightleftharpoons [Fe(CN)_6]^{4-}$, os produtos oriundos após o salto do elétron se encontravam no “local errado” de moléculas de solvente. Foi notado que o campo magnético formado por cada um dos íons era alterado pela nova configuração eletrônica formada, sendo assim os núcleos não teriam tempo para se mover após à passagem do elétron e assim os produtos estariam em um “local” eletrostaticamente desfavorável.

A proposição feita por Libby era de que o ambiente em torno de cada íon apresentaria uma distribuição de cargas média bem parecida antes e depois do salto do elétron, para que a mudança no campo não afetasse o equilíbrio do sistema. Foi notado por Marcus (1993) que embora a hipótese da situação estivesse bem elaborada, a solução não se aplicava para todas as reações de auto-troca iônicas (*self-exchange*), e então a construção lógica de Libby estaria errada em algum ponto (MARCUS, 1993). A partir desse ponto, aconteceu o que se conhece hoje por “teoria de transferência de elétrons” ou “teoria da taxa de reação” de Marcus (1993). Essa teoria está baseada na lógica contrária do que havia proposto Libby, não era a transferência de elétrons que gerava uma readaptação do ambiente, mas uma reorganização das camadas de solventes externas aos reagentes que proporcionavam um ambiente energeticamente favorável para que as reações de transferência eletrônica acontecessem.

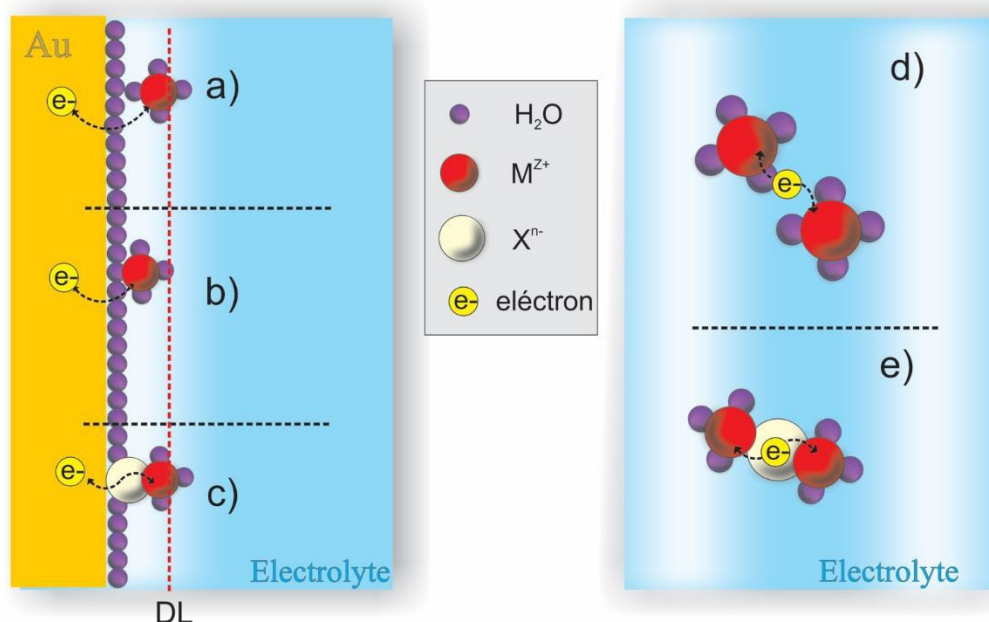
Sendo assim, a reorientação de todas as coordenadas das moléculas de solvatação ao redor do sistema reagente, proporcionaria uma nova configuração que tornaria possível para o elétron transpor a barreira energética e ao mesmo tempo fazer com que os produtos gerados se encontrassem em um “lugar” certo do ambiente de solvatação (MARCUS, 1993).

A teoria proposta por Marcus (1993) foi primeiramente desenvolvida para as reações do tipo esfera externa (*outher-sphere*) (MARCUS, 1956). Essas reações são mais simples e ocorrem quando os reagentes não dividem ligantes entre si e a reorganização das camadas de solvatação ocorre nas partes mais externas aos reagentes, ou seja, aquelas moléculas que não estão formando a camada de solvatação diretamente ligada as moléculas reagentes.

As reações de transferência eletrônica de esfera externa ocorrem entre espécies fracamente acopladas ou até mesmo nas que não estão formando nem rompendo ligações (BARD, 1980; MARCUS 1956), nesse evento as camadas de coordenação internas estão inalteradas enquanto a reação química prossegue através da formação de um complexo

ativado prolongado, com a reorganização das camadas externas até a formação dos produtos, conforme mostrado na Figura 5a e 5b). Como exemplo, pode-se citar a reação que ocorre em uma análise eletroquímica no qual eletrodos imersos em uma solução eletroativa onde os íons da solução são oxidados/reduzidos pela imposição de um campo elétrico. Nesse exemplo, os íons permanecem livres em solução não estando acoplados a superfície do eletrodo, contudo realizam a troca de elétrons ao aproximarem-se da região da dupla camada elétrica, como explicado pela teoria de Marcus (1993), que pode ser visto na Figura 5.

Figura 5: Esquema ilustrativo de que demonstram reações de transferência de elétrons homogênea e heterogênea do tipo *inner* e *outer-sphere*. No exemplo, um eletrodo de ouro metálico está imerso em uma solução eletroativa. As reações demonstram uma TE heterogênea entre um íon metálico complexo (MZ^+) e o eletrodo de ouro (Au). Em a) e b) as reações ocorrem como de esfera externa no formato heterogêneo, como no exemplo citado no corpo do texto, a oxidação/redução de $[Fe(CN)_6]^{3-} + e^- (Au \text{ eletrodo}) \rightleftharpoons [Fe(CN)_6]^{4-}$. Em c) uma situação em que a TE ocorre como esfera interna (*inner-sphere*), onde um íon intermediário (Xn^+) está ligado tanto ao Au quanto ao íon metálico redox. Observe que todas as reações ocorrem na região interfacial do eletrodo, conhecida como dupla-camada elétrica (DL).



Fonte: Essa figura foi baseada na ilustração de *Electrode kinetics: principles and methodology* by Compton, R. G. and Banford, C. H., vol. 26, p. 1019. Nos casos **d)** e **e)** uma solução eletroativa onde os íons redox trocam elétrons homogeneamente no formato d) esfera externa e e) esfera interna.

Pode-se dividir as reações de transferência de elétrons em dois grupos distintos que interferem o estado termodinâmico entre os reagentes. As reações podem ser:

- ✓ Homogêneas: as reações são classificadas como homogêneas quando ocorrem entre espécies na mesma fase termodinâmica (sólida, líquida ou gasosa), como por exemplo, entre íons que estão em uma solução aquosa ou entre dois condutores sólidos, como

citado na Figura 5d e 5e. (CALVO, 1986; BARD, 1980). Como exemplo pode-se citar a reação entre cátions de Cromo (II) e Cobalto (III): $\text{Cr}_{(\text{aq})}^{2+} + \text{Co}_{(\text{aq})}^{3+} \rightleftharpoons \text{Cr}_{(\text{aq})}^{3+} + \text{Co}_{(\text{aq})}^{2+}$, nessa reação ocorre uma transferência de elétrons homogenia e do tipo esfera externa (CALVO, 1986).

- ✓ Heterogêneas: as reações são classificadas como heterógenas quando ocorrem entre fases termodinamicamente diferentes, geralmente essa definição refere-se a processos potencial-dependentes, como reações eletroquímicas entre soluções eletroativas e eletrodos polarizados (como descrito na Figura 5a, 5b e 5c). Como exemplo, pode-se citar a reação de oxirredução do ferro-ferricianeto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}_{(\text{aq})}$ sobre eletrodos de ouro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + e(\text{Au}) \rightleftharpoons [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, nesse exemplo, a reação ocorre entre dois sistemas distintos, um em fase líquida e outro em fase sólida.

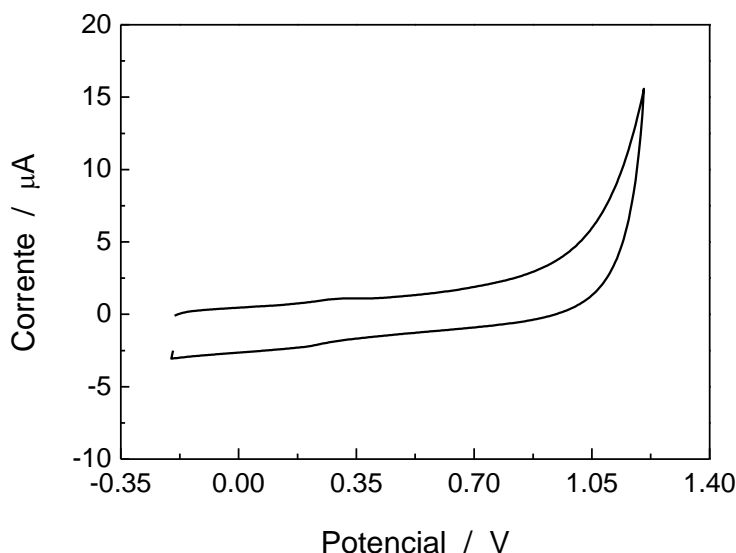
É possível fazer uma relação entre a reação redox de esfera externa e a modificação da superfície do eletrodo, pois no primeiro momento é possível notar que a superfície do eletrodo está disponível para que as transferências eletrônicas ocorram entre as espécies da sonda redox. Fato que não é possível observar após a modificação da superfície do eletrodo, como será descrito posteriormente, pois a formação do filme polimérico sobre a superfície do eletrodo, fez com que a reação de oxirredução do composto ferro/ferricianeto sobre o eletrodo passe a ser dificultada.

Para um condicionamento subsequente ao do par redox, os eletrodos foram avaliados em solução de ácido perclórico, eletrólito suporte dos procedimentos de polimerização. As análises realizadas nesse eletrólito permitem visualizar a existência ou inexistência de interferentes eletroativos na superfície do eletrodo de trabalho, dentro da faixa escolhida para que ocorra a eletropolimerização e também a verificação de interferentes no próprio solvente e no eletrólito suporte. Sendo assim, os eletrodos foram submetidos a sucessivos ciclos de varredura de potencial (entre 3 a 5 ciclos) entre -0,20 a +1,20 V em solução de HClO_4 , esse procedimento garante além da verificação da presença de interferentes uma verificação eletroquímica da superfície do eletrodo a ser modificado.

A Figura 6 apresenta o perfil obtido em todos os estudos reportados nesta etapa. Como referência tomou-se a utilização de eletrodos que apresentavam valores de corrente inferiores a 10 μA (na área de eletroatividade do monômero), quando eram submetidos a ciclos de varredura na faixa de -0,20 a +1,20 V. Assim, todos os eletrodos que seguiam os

critérios descritos acima, foram utilizados no procedimento de modificação. Aqueles eletrodos que não atendiam a tais critérios foram descartados.

Figura 6: VC do EIG em solução HClO_4 0,50 M, $v = 100 \text{ mV/s}$.



5.1.2 Eletropolimerização do 4-ABA

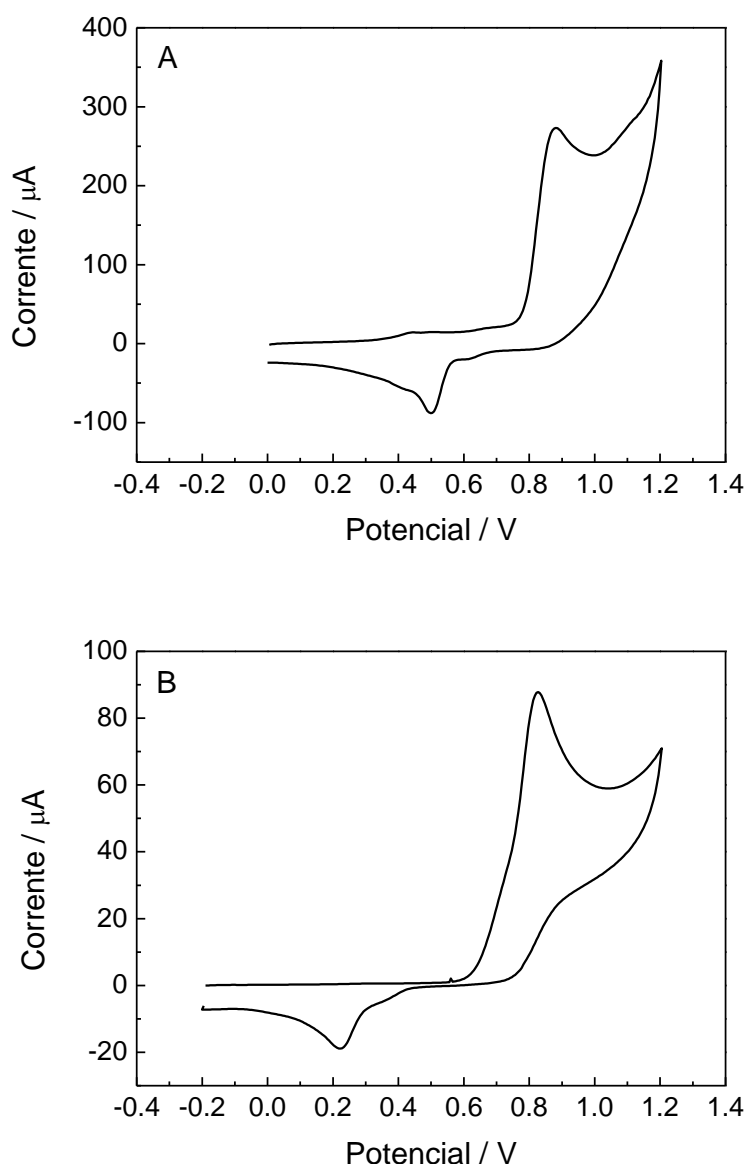
Após a seleção dos eletrodos adequados para dar continuidade ao procedimento de modificação e imobilização do oligonucleotídeo, foi realizada a investigação da região de atividade eletroquímica do 4-ABA sobre os EIG.

O comportamento eletroquímico do 4-ABA, já foi investigado por Ferreira e colaboradores (2015). O perfil voltamétrico obtido pelos autores para o 4-ABA sobre eletrodos de grafite convencionais (EG) foi praticamente o mesmo observado para os EIG, principalmente quando se comparado o primeiro ciclo de potencial onde pode-se observar a oxidação do monômero em aproximadamente +0,90 V. A Figura 7 representa uma comparação entre esses perfis eletroquímicos.

Nota-se que a oxidação eletroquímica do 4-ABA sobre EG (Figura 7A) é observada em potencial de +0,88 V, já no EIG a oxidação é registrada por volta de +0,91 V (Figura 7B). Um processo catódico também é observado no retorno da varredura em potencial de +0,50V no eletrodo de grafite convencional (Figura 3A), sendo que esse mesmo processo, para o EIG, foi registrado em potencial de +0,31 V (Figura 3B). Nota-se também uma grande diferença das correntes envolvidas nos processos catódicos e anódicos, o que está diretamente relacionado com a área geométrica de cada eletrodo utilizado. Como o EG apresenta uma área

superficial maior, uma maior quantidade de corrente passa por essa superfície, já no eletrodo impresso essa quantidade de corrente é por volta de 6 vezes menor em comparação com o eletrodo convencional, sendo que o eletrodo convencional apresenta uma área aproximadamente de $78,5 \text{ mm}^2$ enquanto que o eletrodo impresso apresenta uma área de $12,56 \text{ mm}^2$

Figura 7: Primeiro ciclo de potencial registrado para o 4-ABA em concentração de 2,50 mM utilizando-se ácido perclórico 0.50 M como eletrólito suporte. $\nu = 50 \text{ mV/s}$. Sendo: (A) EG utilizado por Ferreira e colaboradores (2015) e (B) EIG.



Ambos os processos catódicos podem ser atribuídos à redução do material adsorvido na superfície dos eletrodos, o qual inicia sua deposição desde o primeiro ciclo de potencial. Tal confirmação é devida ao fato de que as correntes de pico destes processos

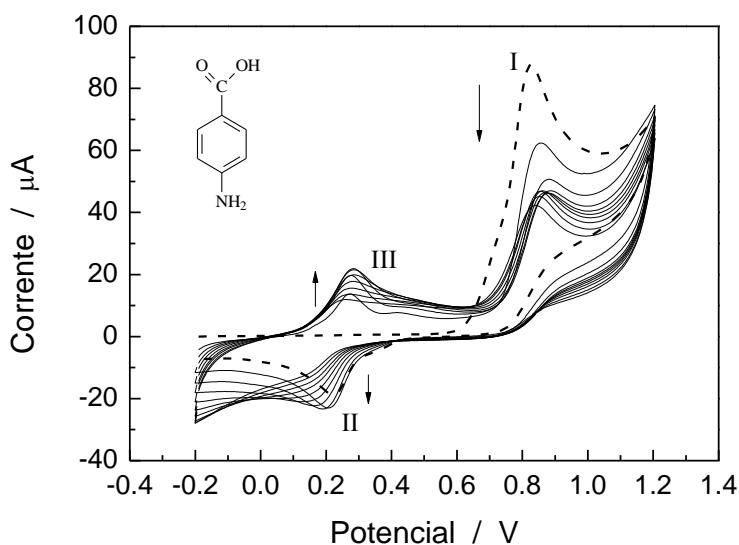
apresentarem um aumento em seus valores a medida que se aumenta o número de ciclos de potencial, conforme será discutido nos tópicos seguintes.

5.1.3 Comportamento eletroquímico dos filmes de poli(4-ABA)

Logo após a avaliação dos eletrodos e o condicionamento dos mesmos, realizou-se a eletropolimerização do monômero em concentração de 2,50 mM. Foram utilizados 10 ciclos (escolhidos empiricamente e sendo um passo a ser otimizado posteriormente) de potencial na faixa de -0,20 a +1,20 V sobre o EIG, em solução de ácido perclórico 0,50 M, como eletrólito suporte. A velocidade de varredura foi mantida em 50 mV/s.

O perfil obtido, após os 10 ciclos de varredura de potencial, para eletropolimerização do 4-ABA está descrito na Figura 8.

Figura 8: VCs consecutivos sobre o EIG em solução de 2,50 mM de 4-ABA. Eletrólito suporte: HClO₄ 0,50 M. Número de ciclos = 10; v = 50 mV/s. Sendo: (---) 1º ciclo de potencial. Inserido: Estrutura química do 4-ABA.



Observa-se que, no primeiro ciclo de potencial, o 4-ABA apresenta um processo de oxidação irreversível. (Figura 8-I) e um pico catódico (Figura 8-II) é visto sem correspondentes anódicos na varredura no sentido inverso. A oxidação do 4-ABA em +0,91 V resulta na formação do cátion-radical, altamente reativo, e que é necessário para iniciar a polimerização do 4-ABA. O fato da formação de um cátion-radical poderia explicar essa possível irreversibilidade, pois esse cátion-radical pode reagir com outro monômero formando um dímero, aumentando assim o efeito mesomérico da estrutura, necessitando assim de menor

energia para a remoção/adição de elétrons o que poderia justificar o aparecimento de picos de corrente em potenciais menos anódicos.

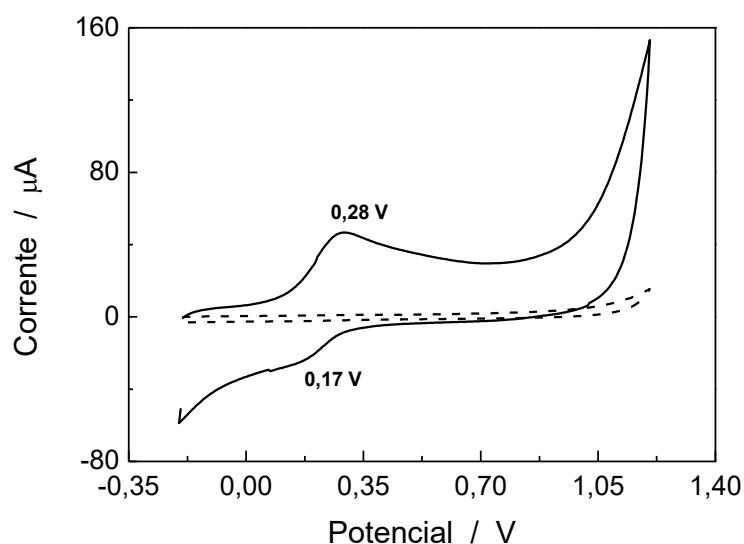
Por outro lado, o processo redox (Figura 8-II e III) é resultante da eletroatividade do filme polimérico, resultado da adsorção sobre o EIG à medida que se realiza os ciclos de potencial. Observa-se ainda um aumento nos valores de corrente destes processos, conforme indicado pelas setas na Figura 8. De forma oposta, um decréscimo nos valores da corrente de pico anódico (Figura 8-I) é observado, podendo ser atribuído ao consumo do monômero na superfície do eletrodo.

Após a eletropolimerização, os poli(4-ABA)/EIG foram lavados com água em abundância e secos sob fluxo de N_2 . Para constatar a modificação eletroquímica dos eletrodos impressos, comparou-se os perfis dos eletrodos modificados e não modificados em solução de ácido perclórico e solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio.

5.1.4 Avaliação da adsorção e eletroatividade dos filmes de poli(4-ABA)

Comparando-se ambos os eletrodos, EIG e poli(4-ABA)/EIG, nota-se na Figura 9 a região que corresponde a adsorção e atividade eletroquímica do filme polimérico formado.

Figura 9: VCs obtidos em solução de ácido perclórico 0,50 M, na ausência do monômero, para os eletrodos: (---) EIG e (—) poli(4-ABA)/EIG. $v = 100$ mV/s.



Pode-se comprovar que houve a modificação da superfície do EIG, uma vez que poder-se observar mudança na corrente faradaica para o poli(4-ABA)/EIG. Foi notável que o perfil do VC realizado em eletrólito suporte ($HClO_4$), antes da modificação do eletrodo, não

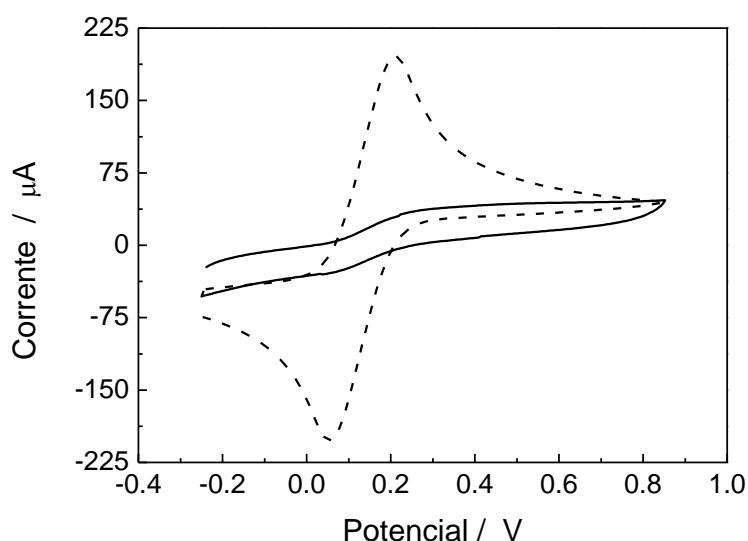
apresentou nenhuma atividade redox na faixa de potencial em que foi realizada a eletropolimerização (-0,20 a +1,20 V). A ausência de correntes anódicas e catódicas é interpretada como a ausência de compostos que apresentem uma atividade redox sobre o eletrodo na faixa estudada.

Realizou-se uma varredura da plataforma modificada poli(4-ABA)/EIG e uma eletroatividade do material formado após a eletropolimerização a valores de potencial +0,17/+0,28 V foi observada. Ao realizar uma comparação entre as Figuras 8 e 9, esse intervalo entre +0,17 e +0,28 V é o mesmo intervalo observado na Figura 8, no qual representa a mesma faixa dos 10 ciclos consecutivos de varredura utilizados para a eletropolimerização do poli (4-ABA). Desta forma, podemos afirmar que a modificação do EIG com o poli(4-ABA) foi realizada com sucesso, e que o material adsorvido apresenta eletroatividade em meio ácido.

5.1.5 Comportamento do poli(4-ABA)/EIG em solução de ferro/ferricianeto de potássio

Avaliou-se a cinética de transporte de cargas dos filmes poliméricos oriundos da eletropolimerização do 4-ABA, onde registrou-se voltamogramas cíclicos em solução aquosa na presença da sonda aniônica ferrocianeto/ferricianeto de potássio. O perfil encontrado foi comparado com o perfil eletroquímico do eletrodo antes da modificação e está apresentado na Figura 10.

Figura 10: VCs do EIG e poli(4-ABA)/EIG em solução aquosa de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,0 mM contendo KCl 0,10 M. Sendo: (---) EIG e (—) poli(4-ABA)/EIG. $v = 100$ mV/s.



A partir do momento em que uma substância eletroativa é adsorvida na superfície de um eletrodo, têm-se uma mudança nas propriedades de transferência eletrônica do sistema como um todo. A capacidade no bloqueio de transferência de carga em eletrodos modificados é amplamente estudada através das reações redox utilizando-se o par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio (SUR; SUBRAMANIAN; LAKSHMINARAYANAN; 2003).

Como vantagem da técnica de voltametria cíclica, é possível investigar a interação do poli(4-ABA) com a sonda redox. É possível através desta interação obter importantes informações sobre a estrutura do polímero em estudo, como a presença de grupos que podem sofrer oxidação e redução eletroquímica.

A Figura 10 mostra os perfis eletroquímicos de ambos os eletrodos, onde é possível notar que o eletrodo impresso antes de sofrer o processo de modificação apresenta um $\Delta E = 160$ mV, para o par redox aniônico. Para o eletrodo que sofreu a modificação de sua superfície é impossível distinguir a ausência ou presença de picos que comprovem a atividade eletroquímica do eletrodo. O perfil observado para o eletrodo modificado é um perfil de um eletrodo totalmente recoberto (passivante) pelo material, fazendo com que a transferência de carga na superfície do eletrodo seja dificultada/limitada.

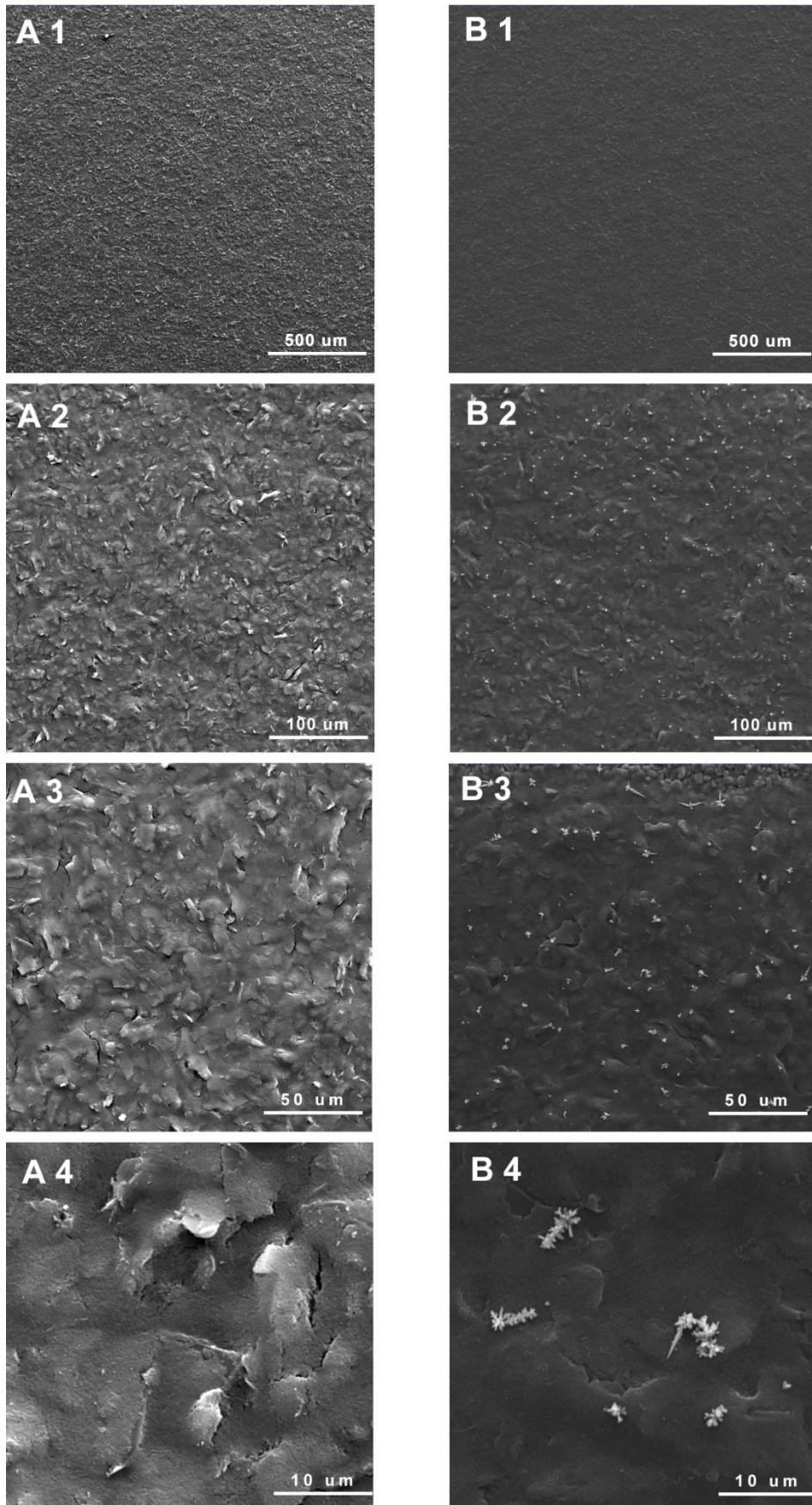
5.1.6 Análises da microscopia eletrônica de varredura

A superfície dos EIG e poli(4-ABA)/EIG foram analisadas, no intuito de se obter informações a respeito da morfologia do filme polimérico. Sendo assim, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com as seguintes ampliações: 100x, 500x, 1000x e 5000x, conforme mostrado na Figura 11.

As imagens obtidas com as ampliações dos eletrodos demonstraram que a superfície do eletrodo impresso é bastante irregular e com muitas imperfeições. Notou-se que essas irregularidades e imperfeições diminuem a partir do momento que o eletrodo passa pelo processo de eletropolimerização, passando a ficar com uma superfície mais homogênea. Essa uniformidade pode ser explicada pela alta passividade do eletrodo impresso após a modificação com os 10 ciclos de varredura de potencial utilizando a VC.

As ampliações de 1000 e 5000x demonstram claramente a modificação da superfície do EIG pela presença do poli(4-ABA), uma vez que a superfície do eletrodo com características irregulares se torna mais uniforme, o que pode estar diretamente relacionado com a presença do filme polimérico.

Figura 11: Imagens de MEV para: (A) EIG e (B) poli(4-ABA)/EIG. Ampliações de (1) 100x, (2) 500x, (3) 1000x e (4) 5000x.



Na Figura 11 (B3 e B4), nota-se ainda que o polímero não recobre toda a superfície do EIG, e a presença de pequenas “ilhas” onde o material cresceu são observadas. Por fim, analisando-se estas imagens, podemos notar que o processo de eletrodeposição do poli(4-ABA) foi satisfatório, e que a morfologia do EIG foi modificada parcialmente pela presença do material depositado.

5.1.7 Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica

Dentre as técnicas eletroquímicas usadas durante este experimento, a de maior versatilidade em relação as outras técnicas eletroquímicas para a investigação das propriedades elétricas da superfície de eletrodos modificados é a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) (YANG; LI; ERF; 2004).

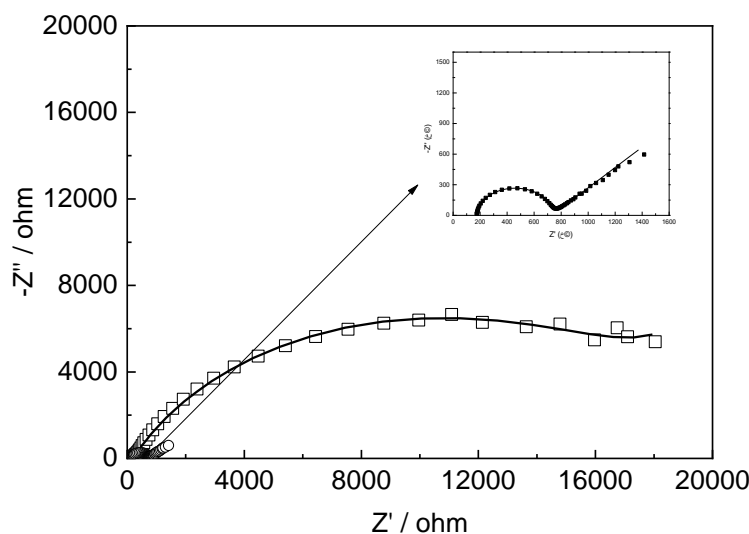
Através da EIE consegue-se informações dos diferentes processos eletroquímicos interfaciais e suas constantes de tempo. É possível associar estes processos a componentes elétricos tais como resistores, capacitores ou indutores, nos levando a um entendimento total do comportamento elétrico do sistema.

Diante disto, utilizou-se primeiramente as medidas de EIE de forma apenas qualitativa. Os diagramas do plano complexo chamados de Nyquist (gráfico de Z' vs $-Z''$) originados para o EIG e poli(4-ABA)/EIG foram utilizados para melhor compreensão dos processos interfaciais de transferência de carga destes eletrodos.

As medidas foram registradas no potencial de circuito aberto (OCP) do sistema, utilizando-se modulação de potencial sinusoidal de 10 mV de amplitude que foi sobreposta ao potencial aplicado, sendo amplitude e o ângulo de fase da corrente resultante registrados em frequências variando de 100 kHz a 10 mHz na presença da sonda redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio. Fez-se uma comparação entre as resistências a transferência de carga (R_{tc}) do eletrodo antes e após a modificação, e os espectros desta análise são mostrados na Figura 12.

Conforme dito anteriormente, utilizou-se primeiramente a EIE somente em caráter investigativo da resistência à transferência de carga para poder comprovar a eficiência da modificação da superfície do eletrodo. Geralmente, os softwares fornecem o diagrama de Nyquist e de Bode ao realizar-se uma medida de EIE. Consegue-se então facilmente, em um primeiro momento, visualizar se houve um aumento ou uma diminuição da resistência a transferência de carga, sendo que esse parâmetro pode ser realmente obtido com a simulação dos dados obtidos.

Figura 12: Diagramas de Nyquist: obtidos para o (o) EIG e (□) poli(4-ABA)/EIG em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. Potencial aplicado = OCP.



Nota-se pela ampliação inserida na Figura 12, que em regiões de alta frequência, o EIG apresenta uma única constante de tempo, seguido por um processo difusional, o que é característico para um circuito de Randles. Os altos valores de R_{tc} podem estar relacionados a característica do eletrodo, o qual é constituído por tintas condutores (prata e grafite). Sendo assim, podemos estimar um valor de R_{tc} de aproximadamente 750 Ω .

Para o poli(4-ABA)/EIG observamos um aumento considerável no valor de R_{tc} . Ao contrário do EIG não é observada uma constante de tempo nítida para a região de altas frequências, e sim, somente um semicírculo, sem a visualização do processo de transporte de massa. O valor de R_{ct} obtido foi de 19 k Ω , mostrando um aumento de 25000x do valor obtido para o eletrodo não modificado. Este resultado corrobora com a capacidade do bloqueio a transferência de carga para o par redox ferro/ferricianeto neste eletrodo, assim como apresentado e discutido na Figura 10. Desta forma, novamente podemos afirmar que, o filme polimérico formado sob a superfície do EIG apresenta características de bloqueio a transferência de carga.

5.2 – Aplicação das plataformas de poli(4-ABA)/EIG na construção do biossensor

A estabilidade, sensibilidade e seletividade são as principais características que um biossensor devem possuir, e estas características somente podem ser garantidas, se o processo de imobilização da biomolécula sob a superfície do transdutor for eficiente, de modo a manter a biomolécula imobilizada e com atividade biológica (PATACAS; 2007).

O objetivo principal desse trabalho, e da grande maioria das metodologias de construção de um biossensor é garantir a máxima atividade da biomolécula durante o processo de imobilização. As mudanças ocorridas após os processos de reconhecimento do alvo complementar podem ser detectadas através dos métodos eletroquímicos, utilizando métodos de detecção direto das bases nitrogenadas que constituem os componentes biológicos envolvidos no processo, ou então através de uma detecção indireta que é feita por meio de intercaladores.

Para se garantir melhor atividade e resposta do material biológico, estes foram imobilizados sobre a superfície dos EIG contendo os filmes poliméricos provenientes do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA). Os filmes poliméricos serviram como plataformas para a imobilização de um oligonucleotídeo (35 pb) contendo uma parte específica para reconhecimento do RNA do Zika vírus. Todos os resultados experimentais foram utilizados com o intuito de verificar a viabilidade do processo de imobilização e reconhecimento do alvo.

Utilizou-se primeiramente a VPD e azul de metileno (AM) como intercalador indireto, uma vez que é de conhecimento prévio que a detecção direta das bases nitrogenadas existentes no oligonucleotídeo requerem potenciais de oxidação elevados, o que pode acarretar em efeitos indesejáveis no processo de detecção, tais como oxidação de interferentes que apresentam um comportamento redox em potenciais inferiores quando comparados às bases purinas.

5.2.1. Construção e caracterização do RNAsensor por VPD utilizando o AM

Buscando uma rapidez nas análises, a transdução eletroquímica após o evento de reconhecimento do alvo apresenta uma grande vantagem, além da instrumentação simples, custo e miniaturização do sistema. Assim, o AM foi escolhido como intercalador, para detecção indireta da imobilização da sonda, bem como do processo de interação do RNAsensor com o alvo complementar. As análises com AM foram investigadas em 4 passos distintos:

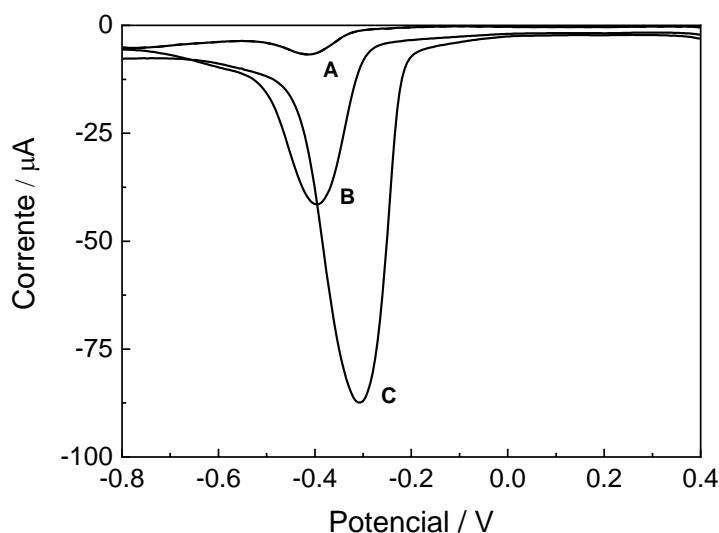
- ✓ 1º passo: Adsorção do azul de metileno no eletrodo, antes do processo de modificação com o poli(4-ABA).
- ✓ 2º passo: Adsorção do azul de metileno no eletrodo após a modificação (poli(4-ABA)/EIG).

- ✓ 3º passo: Adsorção do azul de metileno no eletrodo após a imobilização do oligonucleotídeo específico para reconhecimento do RNA viral (RNAsensor).
- ✓ 4º passo: Adsorção do azul de metileno no biossensor após o processo de interação do RNAsensor com alvo complementar para o Zika vírus.

Todos os 4 passos foram avaliados através da VPD obtidas após 5 minutos de contato do respectivo eletrodo com 20 μ L de AM 0,50 mM.

Como estudo inicial uma concentração de 200mM da sonda P1 foi utilizada com o objetivo de saber se seria possível dar prosseguimento com o desenvolvimento do biossensor, após a utilização de uma concentração elevada, testou-se uma concentração mínima de 10mM, da sonda P1. Comprovou-se então que a imobilização da sonda em 2 distintas concentrações: 10 μ M e 200 μ M, e constatou-se que a imobilização da sonda P1 se dava nessas concentrações extremas (10 e 200 μ M), por fim adotou-se uma concentração média da sonda de 50 μ M para a continuidade dos estudos. Todo o estudo partiu da concentração 200 μ M, os resultados obtidos estão dispostos na Figura 13.

Figura 13: VPDs obtidos para a redução do azul de metileno sobre: (A) EIG, (B) poli(4-ABA)/EIG e (C) RNAsensor. Eletrólito: tampão fosfato 0,10 M em pH 7,0. [Sonda] = 200 μ M.

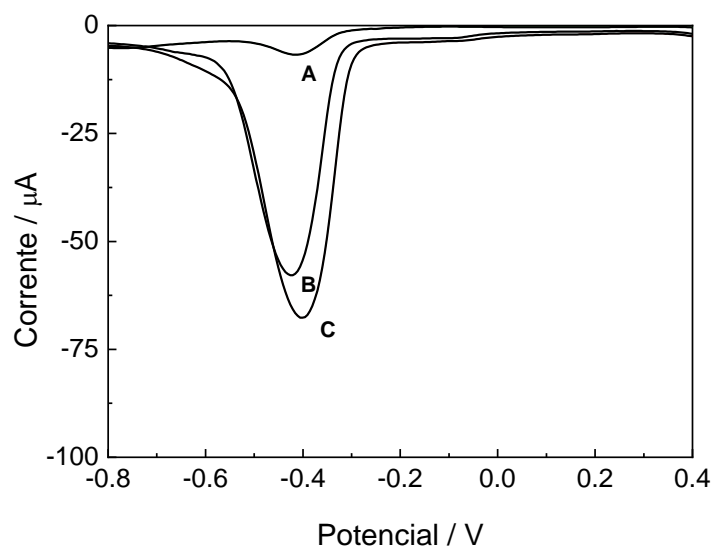


A Figura 13 apresenta três perfis distintos. O perfil 13A representa o resultado obtido referente à redução do azul de metileno no eletrodo de grafite sem modificação. Uma corrente catódica de 6,74 μ A foi observada para o perfil 13A. Tal fato se deu pois sob o eletrodo não existia a presença de nenhum grupo para que ligações químicas ocorressem, levando a não fixação do azul de metileno, desta forma uma baixa atividade do AM era

esperada. O perfil 13B apresenta uma corrente catódica de 41,44 μA , o que indica uma maior adsorção do azul de metileno sob a plataforma modificada poli(4-ABA)/EIG quando comparada a não modificada. Este efeito é esperado, uma vez que, a modificação do EIG apresenta grupos funcionais que podem interagir com o AM de forma a manter uma maior quantidade do material adsorvido sobre a superfície do eletrodo. Já para o perfil 13C, observa-se uma corrente de pico catódica de 87,08 μA , o que apresenta um aumento de aproximadamente 90% no sinal eletroquímico quando comparado ao poli(4-ABA)/EIG, e que pode ser explicado pela interação favorável do azul de metileno com as bases guanina existentes na sonda imobilizada. Desta forma, podemos dizer que a sonda foi efetivamente imobilizada sobre a superfície do eletrodo, considerando o aumento nos valores da corrente de redução do AM.

Após a verificação da detecção indireta da sonda imobilizada em concentração de 200 μA , realizou-se novamente o teste com azul de metileno, mas desta vez utilizou-se uma concentração da sonda de 10 μM . Os resultados podem ser visualizados na Figura 14.

Figura 14: VPDs obtidos para a redução do azul de metileno sobre: (A) EIG, (B) poli(4-ABA)/EIG e (C) RNAsensor. Eletrólito: tampão fosfato 0,10 M em pH 7,0. [Sonda] = 10 μM .



Entre o perfil 14A e o 14C é possível notar um aumento de aproximadamente 90% na corrente de pico catódica, confirmando também a eficiência da imobilização ao utilizar-se a sonda em uma concentração de 10 μA .

A partir desse momento tem-se a certeza de que o processo de imobilização da sonda apresenta eficácia, tanto para uma concentração de 200 μM quanto para uma concentração de 10 μM .

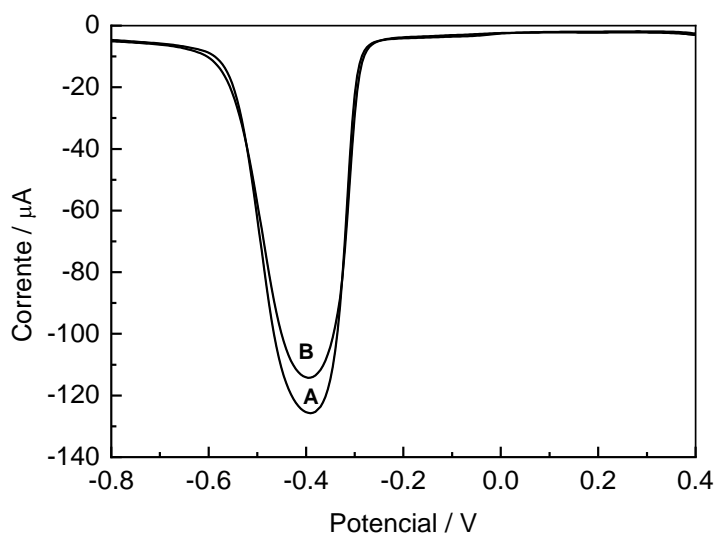
Repetiu-se este experimento e notou-se que para uma concentração de 50 μM os resultados seguiam um padrão em comparação com as concentrações utilizadas anteriormente, onde observou-se um ganho relativo nos valores da corrente anódica. Assim os valores de 50 μM foram fixados como valores de concentração a serem estudados durante a continuação dos experimentos. Essa concentração de 50 μM foi baseada em outro trabalho do grupo, no qual Ricardo *et al* (2015) usa mais ou menos essa concentração para o estudo de desenvolvimento de genossensores aplicados na detecção de *Mycobacterium tuberculosis*.

Como passo seguinte, teve início o estudo do processo de hibridização entre a sonda na concentração de 50 μM e seu alvo complementar com uma diluição de 1:10.

Com o intuito de investigar o evento de reconhecimento do alvo complementar, fez-se todo o processo de imobilização da sonda. Para que ocorresse o reconhecimento, amostras de soro de pacientes diagnosticados com Zika vírus foram colocadas em banho maria a temperatura controlada de 73 $^{\circ}\text{C}$, garantindo assim que a fita que estava enovelada, se abrisse deixando a fita livre para posterior ligação com a sonda.

Utilizou-se uma diluição da amostra do alvo em proporção de 1:10 (amostra/tampão), porém os resultados usando uma detecção indireta com o azul de metileno não foram satisfatórios, conforme pode ser visualizado na Figura 15.

Figura 15: VPDs obtidos para a redução do azul de metileno sobre: (A) RNAsensor e (B) RNAsensor + alvo específico. Eletrólito: tampão fosfato 0,10 M em pH 7,0. [Sonda] = 50 μM .



A Figura 15 mostra uma diminuição da corrente catódica de 125,5 μA para 113,17 μA . Sabe-se que o azul de metileno apresenta uma grande afinidade pelas bases guanina e, sendo assim, após o processo de hibridização entre a sonda e o alvo complementar, ocorre um bloqueio dessa base, pois a mesma faz ligação de hidrogênio com a citosina, impedindo com o que o azul de metileno estabeleça uma interação, diminuindo-se assim o sinal da corrente catódica. Porém essa diminuição de sinal da corrente catódica representa somente 9,8%, o que não representa um sinal analítico muito confiável. A partir desse ponto, os eventos de hibridização passaram a ser estudados com uma técnica eletroquímica que pudesse fornecer outros parâmetros, como por exemplo, a espectroscopia de impedância eletroquímica.

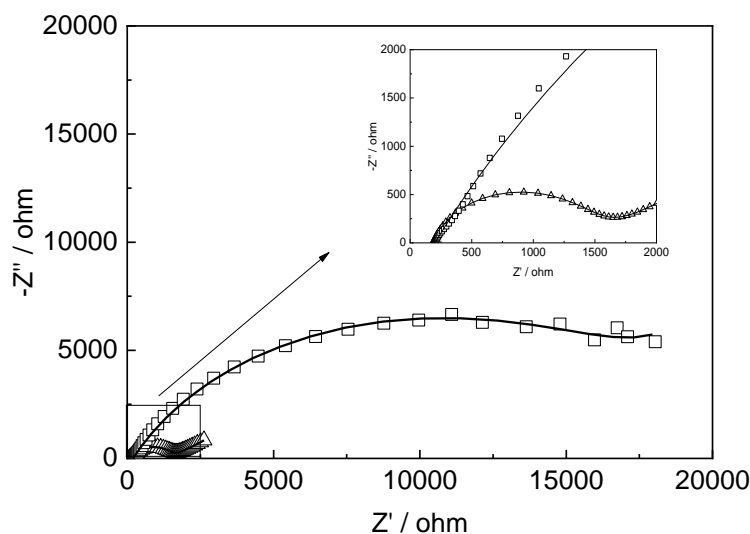
5.2.2. Construção e caracterização do RNAsensor por EIE

Fez-se todo o processo da imobilização da sonda sob o poli(4-ABA)/EIG, e após testes da detecção indireta com azul de metileno, no qual resultados não satisfatórios, foram encontrados, a EIE aparece como uma boa ferramenta para a avaliação das mudanças ocorridas na superfície do eletrodo, uma vez que essa fornece outros alguns parâmetros como por exemplo a resistência a transferência de carga.

Tendo como concentração de trabalho 50 μM fez-se várias análises utilizando a EIE. O parâmetro analisado foi a resistência a transferência de carga, (R_{tc}), pois tinha-se como primeiro interesse a investigação das mudanças ocorridas na superfície do eletrodo, tais como modificação da superfície com o poli(4-ABA), a imobilização da sonda e o reconhecimento do alvo complementar. A escolha da R_{tc} se dá pelo fato que é um parâmetro de fácil obtenção ao final das análises, levando em consideração a finalidade do biossensor que é uma análise rápida e confiável. Foi realizada então, uma comparação entre os valores de (R_{tc}) do poli(4-ABA)/EIG e do RNAsensor, os resultados são mostrados na Figura 16.

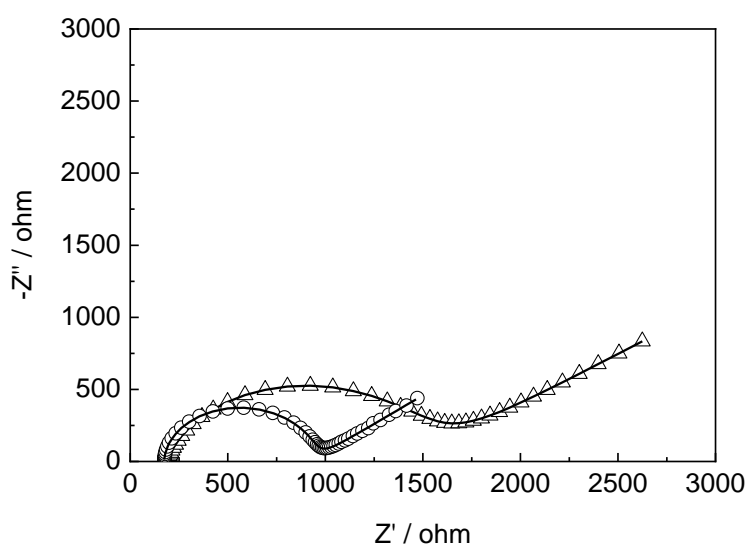
A resistência a transferência de carga decaí drasticamente quando se compara o poli(4-ABA)/EIG com o RNAsensor. O decaimento é na ordem de 91,5%. Pode-se dizer que houve um aumento na eficiência do processo de transferência de carga, a qual pode estar relacionada com a interação da sonda redox (P1) com o material imobilizado (poli(4-ABA)) sobre a superfície do eletrodo, essa diminuição da resistência a transferência de carga pode ser melhor entendida nos circuitos apresentados no Apêndice A.

Figura 16: Diagramas de Nyquist para (Δ) RNAsensor e (\square) poli(4-ABA)/EIG obtidos em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. Eap = OCP.



Em seguida, comparou-se o espectro de Nyquist do oligonucleotídeo imobilizado sobre o EIG (eletrodo sem modificação) e sobre poli(4-ABA)/EIG (eletrodo modificado) a fim de se verificar a contribuição do filme polimérico na imobilização da sonda. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 17.

Figura 17: Diagramas de Nyquist obtidos para a imobilização do oligonucleotídeo sobre: (o) EIG e (Δ) poli(4-ABA)/EIG em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. Eap = OCP.

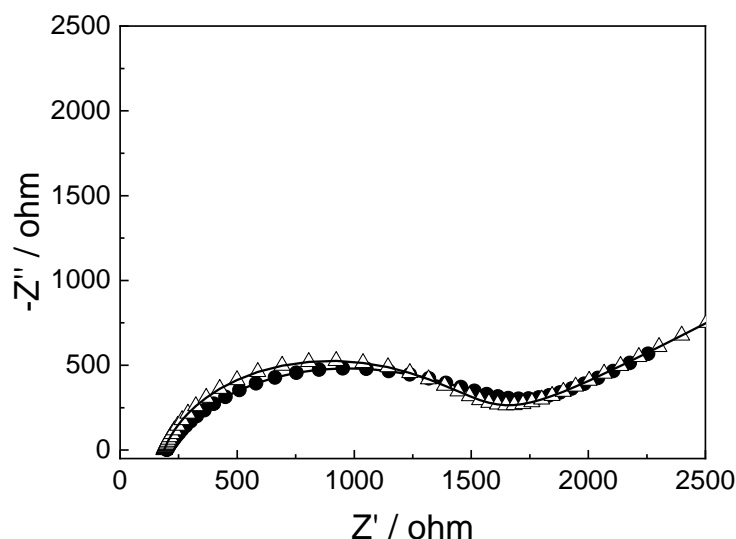


Pelos resultados obtidos, nota-se pela Figura 17 que o eletrodo contendo o filme polimérico apresenta maior resistência a transferência de carga quando comparado a imobilização da sonda sobre o eletrodo não modificado. Tem-se um valor de R_{tc} de 998,64 Ω

para a imobilização da sonda sob o eletrodo limpo e de $1.694,42 \, \Omega$ para a imobilização da sonda sob a plataforma poli(4-ABA)/EIG ou seja, um aumento de 41% do valor de R_{tc} , garantindo-se uma melhoria no processo de imobilização da sonda sobre a superfície modificada.

Como passo subsequente, passou-se a estudar os processos de reconhecimento do alvo complementar. Tentou-se verificar a eficácia de tal evento, sem que a estrutura do RNA estivesse enovelada, deixando livre as bases para um possível reconhecimento. O perfil obtido é mostrado na Figura 18.

Figura 18: Diagramas de Nyquist obtidos para (Δ) RNAsensor e (\bullet) RNAsensor + alvo complementar (sem aquecimento alvo) obtidos em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. E_{ap} = OCP.

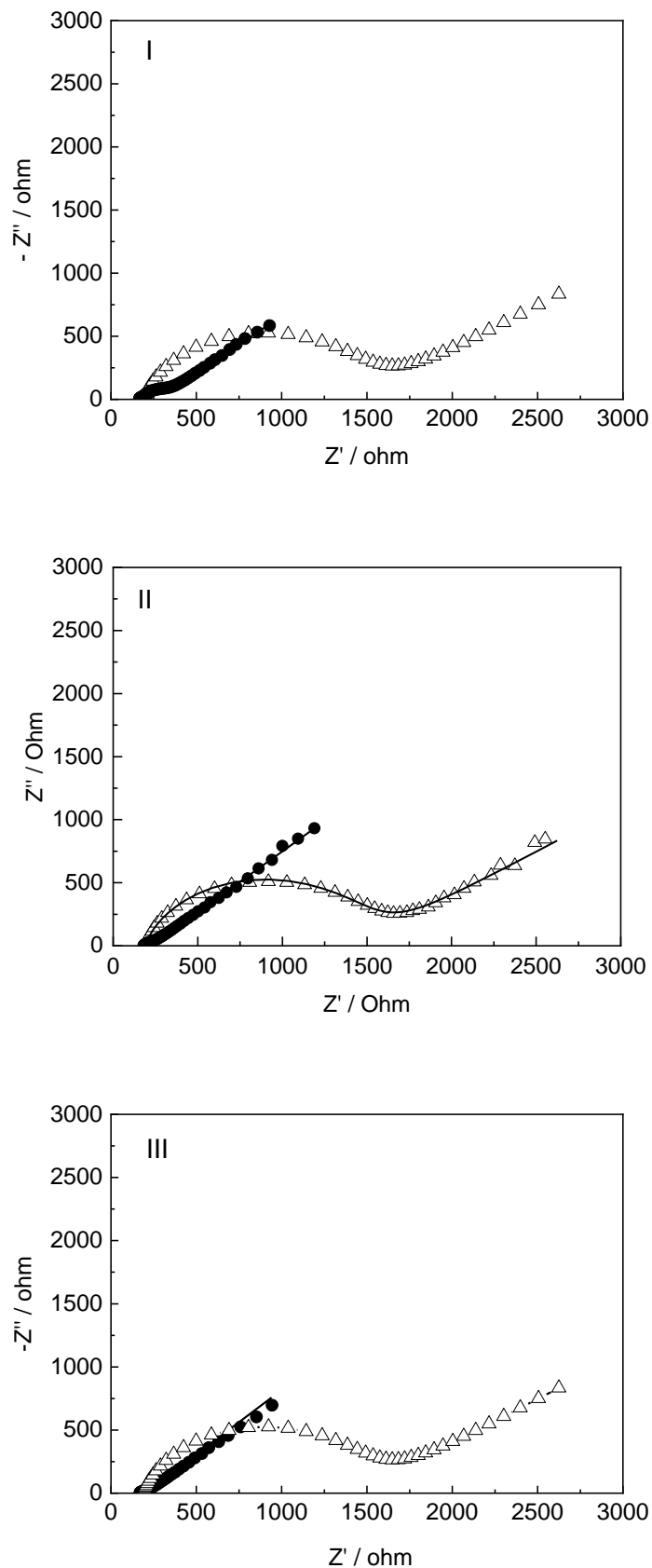


Os perfis encontrados para RNAsensor e RNAsensor + alvo complementar apresentados na Figura 18 são idênticos. Tal fato deu-se pelo não desenovelamento do RNA da amostra alvo, impedindo com que o evento de reconhecimento ocorresse. Ambos os perfis apresentaram valor de R_{tc} de aproximadamente $1.690 \, \Omega$.

Finalizando a primeira parte do estudo, investigou-se as mudanças na superfície dos eletrodos após a hibridização com o alvo complementar diluído em três proporções distintas: 1:10, 1:100 e 1:1000.

Os resultados obtidos para cada diluição podem ser observados nas Figura 19, sendo que os experimentos de hibridização foram realizados em duplicata.

Figura 19: Diagramas de Nyquist obtidos para (Δ) RNAsensor e (\bullet) RNAsensor + alvo complementar obtidos em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. Eap = OCP. Amostras do alvo complementar diluídas em: (I) 1:10, (II) 1:100 e (III) 1:1000.



A priori, não é possível notar nenhuma distinção dentre as 3 diluições (1:10, 1:100, 1:1000) investigadas, pois o perfil apresentado por todas os diagramas de Nyquist obtidos são muito idênticos, porém é notoriamente possível constatar que o evento de reconhecimento do alvo complementar ocorre nas 3 diluições investigadas, fato que não era possível observar com a detecção indireta através do azul de metileno utilizando a VPD.

Por outro lado, podemos notar que os valores de R_{tc} diminuem drasticamente na presença do alvo complementar, reduzindo-se assim a resistência do sistema na transferência eletrônica do par redox.

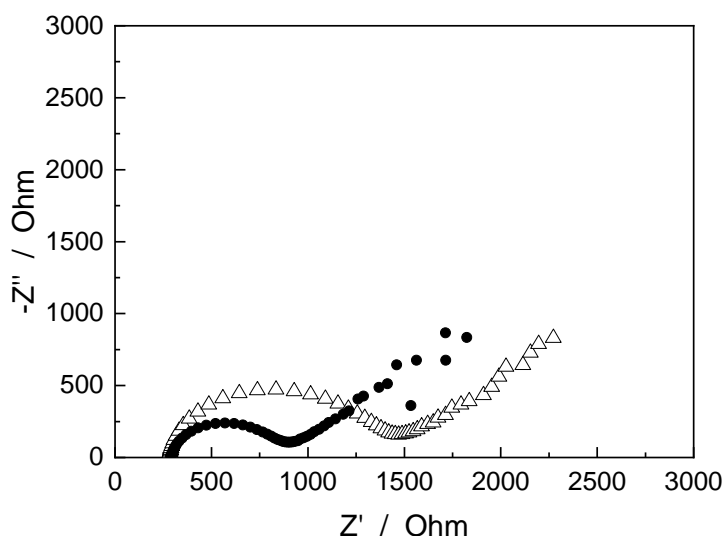
Uma possível explicação para tais resultados pode ser entendida como uma saturação da área ativa dos eletrodos, independente da diluição do alvo utilizada (1:10, 1:100 ou 1:1000). Portanto, não há diferenciação significativa entre os perfis encontrados. Mesmo não sendo possível a diferenciação dos perfis encontrados com as diluições é possível fazer a distinção entre o perfil antes e após o processo de hibridização perfeitamente, pois os perfis encontrados são bastantes distintos do perfil obtido somente quando se tem a sonda imobilizada sobre a superfície do eletrodo.

Para fins de averiguar sobre a influência da temperatura no processo de reconhecimento do alvo, bem como reconhecer se realmente o espectro de impedância observado estava relacionado com aquele desejado obtido na Figura 19, realizou-se uma prova em branco, onde a amostra foi trocada por água, e seguiu-se as mesmas condições experimentais de realização do experimento daquelas realizadas para a Figura 19.

Os resultados dos ensaios, onde água foi utilizada como amostra no lugar do alvo, com o objetivo de comprovar diferenças de perfis entre sonda + alvo e sonda + água são mostrados na Figura 20.

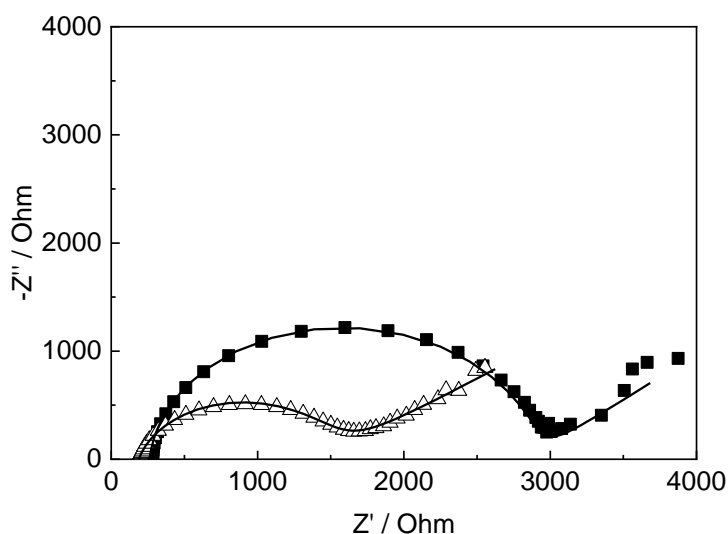
Pode-se perceber que mesmo com uma diminuição dos valores de R_{tc} os perfis encontrados para o evento de reconhecimento e o perfil quando utilizado a água no lugar do alvo complementar são totalmente distintos (ver Figura 20 e 19). Por outro lado, os valores de R_{tc} diminuem muito mais, quando se tem o alvo complementar como parte integrante do processo, o que sugere que a resposta obtida na Figura 19 está relacionada com o reconhecimento do RNA viral.

Figura 20: Diagramas de Nyquist obtidos para (Δ) RNAsensor e (\bullet) RNAsensor + água obtidos em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. Eap = OCP.



Após a confirmação que o perfil ao se utilizar água no lugar do alvo, não se assemelha ao perfil encontrado ao ocorrer o evento de reconhecimento entre o RNAsensor e o alvo específico do ZIKV, estudou-se a interação do biossensor com um alvo complementar distinto (alvo não específico). Escolheu-se um alvo que apresentasse basicamente os mesmos sintomas de infecção e que dificultasse o diagnóstico, sendo assim, utilizou-se outro tipo de soro como alvo, porém soro do vírus da dengue. Os resultados são mostrados na Figura 21

Figura 21: Diagramas de Nyquist obtidos para (Δ) RNAsensor, (\blacksquare) RNAsensor + alvo inespecífico obtidos em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz. Eap = OCP.



Na Figura 21 tem-se o perfil do RNAsensor, assim como da interação do biossensor com um alvo inespecífico (interferente). Pode-se notar que o perfil encontrado quando usado o alvo inespecífico, não se assemelha nem um pouco com o perfil encontrado quando se tem o reconhecimento com o alvo específico para o ZIKV. Na Figura 19-III é possível notar que mesmo com uma diluição de 1:1000 do alvo complementar, a resistência a transferência de carga diminui drasticamente, já na presença do interferente, os resultados obtidos não seguiram o mesmo padrão que os resultados obtidos com o alvo complementar. A resistência a transferência de carga dobrou, pode-se então afirmar que os eventos de reconhecimento são distintos entre o RNAsensor e os alvos específicos e não específicos. A Tabela 3 resume todos as resistências a transferência de carga encontradas em cada sistema investigado.

Tabela 3: Resumo dos sistemas apresentados durante o trabalho e das respectivas resistências a transferência de carga obtidas através da técnica de EIE.

Sistema	R_{tc} (Ω)
EIG	731
EIG + oligonucleotídeo	928
poli(4-ABA)/EIG	20.100
RNAsensor	1.488
RNAsensor + alvo específico (sem aquecimento)	1.599
RNAsensor + alvo específico (1:10)	477
RNAsensor + alvo específico (1:100)	258
RNAsensor + alvo específico (1:1000)	226
RNAsensor + alvo inespecífico	2.600

Como ideia principal sobre o trabalho desenvolvido, através dos resultados obtidos, a R_{tc} diminui após o processo de interação entre a sonda e alvo complementar do ZIKV e que não existe diferenciação entre as resistências encontradas ao utilizar-se a o alvo diluído 10 vezes, 100 vezes ou 1000 vezes.

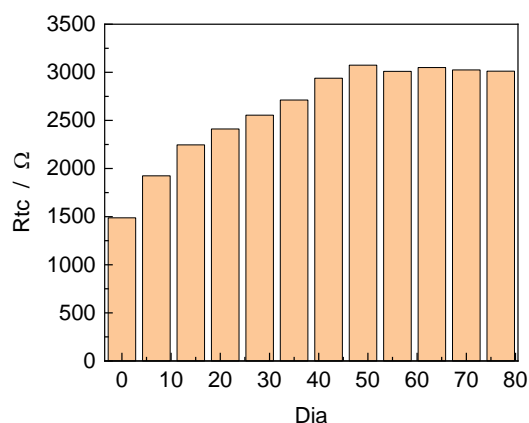
Uma possível explicação seria que mesmo com o alvo diluído 1000 vezes, a área ativa do eletrodo já esteja totalmente recoberta, e que ao se aumentar a concentração do alvo para diluições menores, no caso, 1:100 e 1:10, não é possível se obter nenhuma diferenciação.

A estabilidade do biossensor foi avaliada durante 78 dias, sendo realizada uma coleta feita por semana, entre os dias 17/06/2018 e 02/09/2018. Os resultados das resistências a transferência de carga obtidos estão dispostos abaixo na Tabela 4 e na Figura 22.

Tabela 4: Valores de R_{tc} para o RNAsensor obtidos durante 78 dias de armazenamento a 10 °C.

Dia	R_{tc} (Ω)
17/06/2018	1488
24/06/2018	1924
01/07/2018	2246
08/07/2018	2411
15/07/2018	2555
22/07/2018	2712
29/07/2018	2939
05/08/2018	3074
12/08/2018	3010
19/08/2018	3050
26/08/2018	3025
02/09/2019	3012

Figura 22: Gráfico representativo das R_{tc} em função do período de armazenamento do RNAsensor.



É possível notar que ao longo das semanas a R_{tc} do RNAsensor aumenta em relação a primeira medida, e se estabiliza praticamente em 40 dias. Uma possível explicação para esse fato é que análises consecutivas com o mesmo eletrodo, lavagens, contato com a solução favoreceram o efeito da lixiviação do material biológico adsorvido sobre a superfície do eletrodo. Porém é possível notar que ao fim dos 78 dias, começamos a ter uma estabilização do sinal do biossensor indicando a estabilização do sistema. É possível perceber que mesmo após várias análises e com o decorrer o tempo o eletrodo apresenta uma resposta significativamente diferente quando comparado com o sistema poli(4-ABA)/EIG que apresentou uma resistência a transferência de carga na ordem de 20.000 Ω .

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Observou-se e comprovou-se que a eletropolimerização do poli(4-ABA) sobre a superfície do eletrodo impresso de grafite. Constatou-se a modificação do eletrodo impresso através do uso de três técnicas distintas, sendo elas, voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e microscopia eletrônica de varredura. Pode-se afirmar que o perfil do filme formado sobre o eletrodo impresso se assemelha muito ao filme formado sobre o eletrodo convencional de grafite.

Além da comparação entre os filmes poliméricos, o próprio filme em si é um grande precursor na construção de um genossensor como plataforma funcionalizada para a identificação da infecção do Zika vírus.

Espectroscopia de impedância eletroquímica mostrou-se como uma técnica bastante versátil para investigação do reconhecimento do RNA viral pelo RNAsensor construído, sendo melhor do que a VDP a qual utilizou a detecção indireta através do azul de metileno. Porém, não foi observada diferenciação significativa nos espectros de EIE para a atuação do RNAsensor frente a três diluições do alvo complementar utilizadas.

O RNAsensor proposto apresentou boa seletividade para o alvo complementar da RNA viral da ZIKV, pois resultados distintos foram obtidos frente a amostras específicas e não específicas. O alvo específico fez com que a resistência a transferência de carga diminuísse de 1448Ω para valores abaixo de 500Ω , já o alvo não específico fez com que esta resistência dobrasse em relação ao eletrodo somente com a sonda (RNAsensor).

Realizou-se testes de estabilidade do RNAsensor avaliando-se sua R_{tc} durante 78 dias, e conclui-se que o sistema apresentou uma variação da atividade ao decorrer destes dias, o que leva-se a concluir que o sistema proposto apresenta uma boa estabilidade.

Como perspectivas para o trabalho realizado, pode-se realizar um estudo mais profundo sobre a contaminação com interferentes sobre a matriz escolhida, já que é de conhecimento prévio à similaridade entre as três contaminações: ZIKV, DENGUE e CHIKUNGUYA, é possível realizar o estudo com diferentes modificações da matriz escolhida, realizar o aumento da especificidade da sonda utilizada, aumentando a quantidade de pares de bases fará com que o sensor proposto se torne mais específico para a ZIKV. Propõe-se também otimizar o tempo de imobilização da biomolécula sobre o eletrodo modificado.

Como auto-crítica ao trabalho realizado. É compreensível que o trabalho apresentado está nos passos iniciais e que um conhecimento muito específico sobre técnicas

eletroanalíticas e um entendimento específico para cada sensor proposto é necessário. Destaca-se também a importância de que os métodos de análise venham como uma ferramenta de bastante utilidade para os seres humanos, porém estudos de análise e detecção de doenças devem andar de mãos dadas com estudos/pesquisas de erradicação ou diminuição das patologias detectadas, pois de nada adianta pararmos no ponto de detecção e não avançarmos para o ponto de cura/erradicação.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, B.; MAJUMDAR, S. Polymers in sensor applications. **Progress in Polymer Science**, v. 29, n. 7, p. 699-766, 2004.
- ANDRADE, V. M. **Confecção de biossensores através da imobilização de biocomponentes por eletropolimerização de pirrol**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2006.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods, fundamentals e applications**. New York: John Wiley & Sons, 1980.
- BARSAN, M. M.; BRETT, C. M. A. A new modified conducting carbon composite electrode as sensor for ascorbate and biosensor for glucose. **Bioelectrochemistry**, v. 76 n. 1-2, p. 135-140, 2009.
- BOORMAN, J.P.; PORTERFIELD, J.S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika vírus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol.50, p. 238-42, 1956.
- BLOHM, D. H.; GUISEPPI-ELIE, A. New developments in microarray technology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 1,2, n. 1, p. 41-47, 2001.
- BRUGNERA, M. F.; SANTOS, D. P.; ZANONI, M. V. B. Eletrodo modificado com filme de poli aminoácido para determinação de hidrazina em água de caldeira. **Eclética Química**, v. 31, n. 4, p. 63-68, 2006.
- BRYANT, J. E.; HOLMES, E. C.; BARRETT, A. D. T. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 5, p. 668-673, 2007.
- CALVO, E. J. Fundamentals. The basics of electrode reactions. In: BAMFORD, C. H.; COMPTON, R. G. **Electrode kinetics: principles and methodology**. Amsterdam: Elsevier, 1986. p. 1-78.
- CONROY, P. J. *et al.* Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 10-26, 2009.
- DAVIES, P. W.; BRINK JUNIOR, F. Microelectrodes for measuring local oxygen tension in animal tissues. **Review of Scientific Instruments**, v. 13, n. 12, p. 524-533, 1942.
- DAVIS, F.; HIGSON, S. P. J. Strutured thin films as functional components within biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 1, p. 1-20, 2005.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. *Zika virus* (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.
- D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 334, n. 1-2, p. 41-69, 2003.

EPSTEIN, J. R.; LEE, M.; WALT, D. R. High-density fiber-optic genosensor microsphere array capable of zeptomole detection limits. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 8, p. 1836-1840, 2002.

FERREIRA, L. F. *et al.* Preparation, characterization, and application in biosensors of functionalized platforms with poly (4-aminobenzoic acid). **Journal of Materials Science**, v. 50, n. 3, p. 1103-1116, 2015.

FOY, B. D. *et al.* Probable non-vector-borne transmission of *Zika virus*, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880-882, 2011.

FREIRE, C. C. M. *et al.* Spread of the pandemic *Zika virus* lineage is associated with NS1 codon usage adaptation in humans. **BioRxiv: The Preprint Server for Biology**, p. 1-8, 2015.

FREIRE, R. S.; DURAN, N.; KUBOTA, L. T. Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 4, p. 456-462, 2002.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 345-359, 2002.

GIL, E. D. S.; KUBOTA, L. T. AND YAMAMOTO, Y. I.; Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**, v. 22, p. 874-881, 1999.

GOMES, M. F. **Caracterização estrutural do poli(ácido 4 hidroxifenilacético) eletropolimerizado sobre eletrodo de grafite e sua aplicação no desenvolvimento de imunossensor amperométrico para diagnóstico de Leishmaniose Visceral**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2011.

GONZÁLEZ, S. Zika y Zikafobia: una página en construcción . **Arch Pediatr Urug**, vol.87, n.1, p. 53-61, 2016.

GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 876-921, 2007.

HANSEN, B. **Metodologia para produção de biossensores amperométricos enzimáticos utilizando polímeros condutores: caso polianilina**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2011.

HAYES, E. B. *Zika virus* outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347-1350, 2009.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. *Zika virus* spreads to new areas: region of the Americas, May 2015 - January 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 55-58, 2016.

HENSTRIDGE, M. C. *et al.* Marcus-Hush-Chidsey theory of electron transfer applied to voltammetry: a review. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 12-20, 2012.

INZELT, György. Conducting polymers: a new era in electrochemistry. **Springer Science & Business Media**, p. 1, 2012.

INZELT, G. Rise and rise of conducting polymers. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 15, n. 7-8, p. 1711-1718, 2011.

ISSA, R.; HAMDAN, N. A.; NOH, M. F. M. Differential pulse voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue on screen printed carbon electrode for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. **Biotechnology**, v. 9 n. 3, p. 304-311, 2010.

KARYAKIN, A. A. *et al.* Processible polyaniline as an advanced potentiometric pH transducer. Application to biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 13, p. 2534-2540, 1999.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of *Zika virus* associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232-1239, 2008.

LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R. Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 417-424, 1999.

LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Microbial biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, n. 1-2, p. 200-210, 2006.

LIU, J.; LI, J. AND DONG, S.; Interaction of brilliant cresyl blue and methylene green with DNA studied by spectrophotometric and voltammetric methods. **Electroanalysis**, 8:(8-9), 1996, 803-807.

LIU, S. *et al.* Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 335, n. 3, p. 239-243, 1996.

LOWE, C. R. Overview of biosensor and bioarray technologies. **Handbook of Biosensors and Biochips**, p. 7-22, 2008.

LUO, X. *et al.* Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. **Electroanalysis**, v. 18, n. 4, p. 319-326, 2006.

LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Biosensor technology: technology push versus market pull. **Biotechnology Advances**, v. 26 n. 5, p. 492-500, 2008.

MALHOTRA, B. D.; CHAUBEY, A.; SINGH, S. P. Prospects of conducting polymers in biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 578, n. 1, p. 59-74, 2006.

MARCUS, R. A. Electron-transfer reactions in chemistry: theory and experiment (nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, v. 32, n. 8, p. 1111-1121, 1993.

MARCUS, R. A. On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. I. **Journal of Chemical Physics**, v. 24, n. 5, p. 966-978, 1956.

MACNAMARA, F.N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg** ;v. 48, p. 139-45, 1954.

MARRAZZA, G. *et al.* Detection of human apolipoprotein E genotypes by DNA biosensors coupled with PCR. **Clinica Chimica Acta**, v. 307, n. 1-2, p. 241-248, 2001.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, v. 77, n. 2, 237-256, 2002.

MUSSO, D. ET AL. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia November 2013 to February 2014. **Euro Surveillance**, vol. 19, n.14,1-3, 2014.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; **Desenvolvimento de biossensores e sensores biomiméticos para determinação de compostos fenólicos. Tese de Doutorado**, 2007, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis.

PATACAS, R. C. **Desenvolvimento, caracterização e otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Porto, 2007.

PEREIRA, E. M. C. C. **Caracterização de filmes de poli[Ni(saltMe)] por espectroscopia de impedância electroquímica**. 2003. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2003.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2014.

PIMENTA, D.N. 2015.A Desconstrução da Dengue: de Tropical a Negligenciada. **“Dengue: teorias e Praticas**. 1º ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p. 23-59, 2015.

PINGARRÓN, J. M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 19, p. 5848-5866, 2008.

PIVIDORI, M. I.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Eletrochemicalgenosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 15, n. 5-6, p. 291-303, 2000.

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, 2011. “Decreto No. 7.616, de 17 de novembro de 2011”. Disponível em:
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato20112014/2011/Decreto/D7616.htm.

RIBOVSKI, L. A label-free electrochemical DNA sensor to identify breast cancer susceptibility. **Microchemical Journal**. v. 133, p. 37-42. jul. 2017.

SADKI, S. *et al.* The mechanisms of pyrrole electropolymerization. **Chemical Society Reviews**, v. 29, n. 5, p. 283-293, 2000.

SANTOS, C.C. **Desenvolvimento de plataformas eletroquímicas funcionalizadas com ácido poli (4-aminobenzóico) aplicadas em biossensores**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química), . UFVJM, Diamantina-MG, 2014.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012.

SETHI, R. S. Transducer aspects of biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 9, n. 3, p. 243-264, 1994.

SHARMA, S. K.; SEHGAL, N.; KUMAR, A. Biomolecules for development of biosensors and their applications. **Current Applied Physics**, v. 3, n. 2-3, p. 307-316, 2003.

SHIRAKAWA, H. *et al.* Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, $(CH)_x$. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 16, p. 578-580, 1977.

SHUM, T.T. Discussion: Zika – an epidemic of signification? Disponível em: <http://somatosphere.net/forumpost/discussion-zika-an-epidemicof-signification>, 2016

SILVA, J. J. B. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímico e piezelétrico de DNA para diagnósticos clínicos**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2004.

SINGH, M. *et al.* Urea biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 134, n. 1, p. 345-351, 2008.

SIUZDAK, G. **Mass spectrometry for biotechnology**. San Diego: Elsevier Science, 1996.

SOARES, J. C. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol**. 2011. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, 2011.

SUR, U. K.; SUBRAMANIAN, R.; LAKSHMINARAYANAN, V. Cyclic voltammetric and electrochemical impedance studies on the structure, adsorption kinetics, and barrier properties of some organic dithiol self-assembled monolayers on gold. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 266, n. 1, p. 175-182, 2003.

THÉVENOT, D. R. *et al.* Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2333-2348, 1999.

TREICHLER, P.A. AIDS, Homophobia and Biomedical Discourse: an epidemic of significatio. **Cultural Studies**, p. 263-305, 1987.

VASCONCELOS, P. F. C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9-10, 2015.

VENTURA, D. From Ebola to Zika: international emergencies and the securitization of global health. **Cad. Saúde Pública [online]**. vol.32, n.4, 2016.

VIEIRA, S. N. **Desenvolvimento e caracterização de um novo material polimérico para aplicação em biossensores eletroquímicos na detecção de compostos fenólicos**. 2011. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2011.

VO-DINH, T., B. CULLUM, **Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 366: p. 540-551, 2000.

WANG, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, n. 1-2, p. 47-53, 1999.

WANG, J. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: a review. **Electroanalysis**, v. 17, n. 1, p. 7-14, 2005a.

WANG, J. Electrochemical nucleic acid biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 469, n. 1, p. 63-71, 2002.

WANG, J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. **Analyst**, v. 130, n. 4, p. 421-426, 2005b.

WEIR, L. & MYKHALOVSKIY, E. Global Public Health Vigilance: Creating a World on Alert. **Abingdon: Routledge**, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) .Situation report. Disponível em: <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/5-may-2016/en/>

WOOD, G. A.; IROH, J. O. Efficiency of electropolymerization of pyrrole onto carbon fibers. **Synthetic Metals**, v. 80, n. 1, p. 73-82, 1996.

YANG, L.; LI, Y.; ERF, G. F. Interdigitated array microelectrode-based electrochemical impedance immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 4, 1107-1113, 2004.

YANG, W *et al.* Evidence for the direct interaction between methylene blue and guanine bases using DNA-modified carbon paste electrodes. **Electroanalysis**, v. 14, n. 18, p. 1299-1302, 2002.

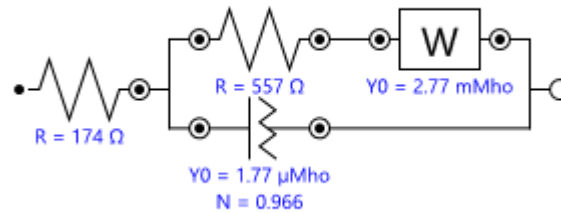
ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of *Zika virus* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ZHU, N. *et al.* Electrochemical detection of DNA hybridization using methylene blue and electro-deposited zirconia thin films on gold electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 510, n. 2, p. 163-168, 2004.

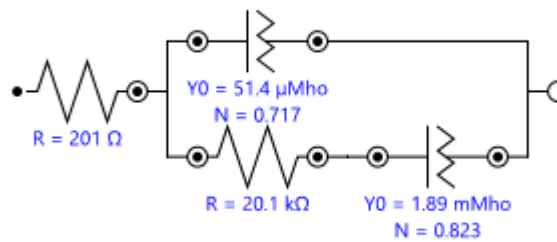
Apêndice A

Circuitos utilizados para a simulação dos dados através da espectroscopia eletrônica de varredura.

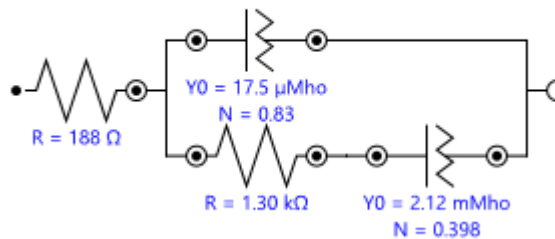
Cicuito 01: Circuito representativo utilizado na simulação dos dados do EIG.



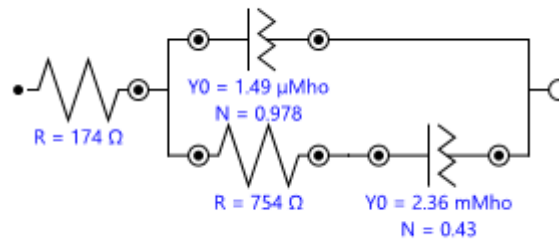
Cicuito 02: Circuito representativo utilizado na simulação dos dados do poli(4-ABA)/EIG.



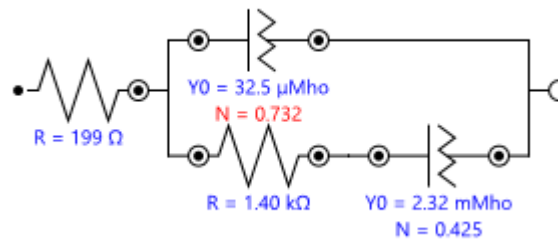
Cicuito 03: Circuito representativo utilizado na simulação dos dados do RNAsensor



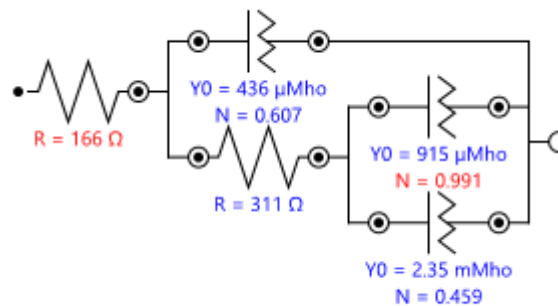
Cicuito 04: Circuito representativo utilizado na simulação dos dados do ssRNA/EIG.



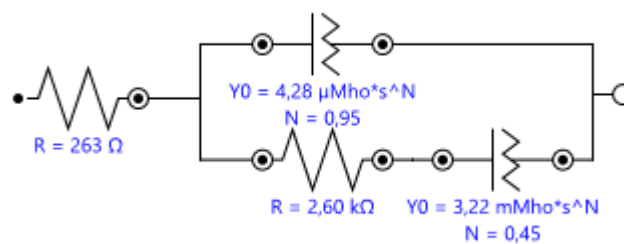
Cicuito 05: Circuito representativo utilizado na simulação dos dados do RNAsensor + alvo específico (sem abertura de fita).



Cicuito 07: Circuito representativo utilizado na simulação dos dados do RNAsensor + alvo específico 1:10, 1:100 e 1:1000.



Cicuito 08: Circuito representativo utilizado na simulação dos dados do RNAsensor + alvo inespecífico



O circuito elétrico equivalente 1 consiste em um elemento ôhmico representando a resistência não compensada da solução (R_s), seguido por um arranjo em paralelo de elementos capacitivo (Q_{dl}), resistivo (R_{ct}) e difusivo (W). Enquanto os elementos Q_{dl} e R_{ct} são representativos da pseudo-capacitância interfacial e da resistência de transferência de carga no potencial de equilíbrio, respectivamente, o elemento W representa o fenômeno da difusão linear semi-infinita ocorrendo na interface eletrodo/solução considerada como sendo plana.

Os circuitos elétricos equivalentes 2-5 consistem em um elemento ôhmico representando a resistência não compensada da solução (R_s), seguido por um arranjo em paralelo de elementos capacitivo (Q_1), resistivo (R_1) e difusivo (Q_2). Enquanto os elementos Q_1 e R_1 são representativos da pseudo-capacitância interfacial e da resistência de transferência de carga no potencial de equilíbrio, respectivamente, o elemento Q_2 representa o fenômeno da difusão linear semi-infinita ocorrendo na interface eletrodo/solução considerada como sendo plana.

A substituição do elemento W pelo elemento Q_2 permite incorporar desvios da idealidade devido a processos de dispersão de frequência ou difusão em regime não linear. Portanto, enquanto que o elemento de Warburg idealizado apresenta um expoente fixo de 0,5 que caracteriza uma reta com inclinação unitária no plano complexo, no caso do uso do elemento Q_2 o valor do expoente fica livre para variações ao redor de 0,5 durante a simulação numérica, permitindo assim obter uma melhor simulação dos dados experimentais para os casos complexos envolvendo eletrodos sólidos com superfícies irregulares.

Por outro lado, circuito equivalente 7 consiste em uma adaptação do circuito de Randles, onde o elemento difusional foi substituído por um subcircuito RQ que apresenta um elemento RF referente à resistência ao transporte iônico e o elemento QF referente à pseudocapacitância, ambos associados ao processo de carga/descarga da camada biológica. Neste caso, o transporte eletrônico através da camada biológica é acompanhado pelo transporte de contra íons. O movimento destes íons pode ser modelado como o carregamento e descarregamento de um capacitor e, uma vez que a “superfície” da camada biológica apresenta geometria irregular, esta dupla camada apresenta o comportamento de CPE (elemento de fase constante).

